

Ana Carolina Carneiro Aguirre Casarotti

**SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B E PARÂMETROS IMUNES
NA EVOLUÇÃO DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO COM
SUPRADESNIVELAMENTO DO SEGMENTO ST**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo - Escola Paulista de Medicina
- para obtenção do Título de Doutor em
Ciências pelo Programa de Pós-Graduação
em Cardiologia

São Paulo
2019

Ana Carolina Carneiro Aguirre Casarotti

**SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B E PARÂMETROS IMUNES
NA EVOLUÇÃO DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO COM
SUPRADESNIVELAMENTO DO SEGMENTO ST**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo - Escola Paulista de Medicina –
para obtenção do Título de Doutor em
Ciências pelo Programa de Pós-Graduação
em Cardiologia

Orientador:

Prof. Dr. Francisco Antônio Helfenstein
Fonseca

Coorientadora:

Prof. Dra. Ieda Maria Longo-Maugeri

Coorientadora:

Prof. Dra. Maria Cristina de Oliveira Izar

São Paulo
2019

Casarotti, Ana Carolina Carneiro Aguirre

Subpopulações de linfócitos B e parâmetros imunes na evolução do infarto agudo do miocárdio com supradesnívelamento do segmento ST. Ana Carolina Carneiro Aguirre

Casarotti – São Paulo, 2019.

xv, 92f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós graduação em Cardiologia.

Título em inglês: B lymphocytes subsets and immune responses in ST-segment elevated myocardial infarction evolution

1.Linfócitos B. 2.Infarto do miocárdio. 3.Fibrose miocárdica. 4. Inflamação 5.Citocinas

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA – DISCIPLINA DE CARDIOLOGIA

Chefe do Departamento de Medicina: Dra. Ana Luisa de Godoy

Coordenação do Curso de Pós Graduação: Dr. Francisco Antônio Helfenstein
Fonseca

Ana Carolina Carneiro Aguirre Casarotti

**SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B E PARÂMETROS IMUNES
NA EVOLUÇÃO DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO COM
SUPRADESNIVELAMENTO DO SEGMENTO ST**

Presidente da Banca: Prof. Dr. Francisco Antônio Helfenstein Fonseca

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rui Manuel dos Santos Póvoa

Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

Prof. Dra. Viviane Zorzanelli Rocha Giraldez

Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Suplente: Prof. Dr. Henrique Tria Bianco

Suplente: Prof. Dr. Ruy Fernando Ramos

Dedicatória

Dedico esta vitória ao meu marido Márcio e à minha família, meus pais e irmãos,
pelo amor e apoio incondicional, sempre

Agradecimentos

Agradeço especialmente ao Dr. Francisco, e também à Dra. Cristina, pela oportunidade, colaboração e inestimável ampliação do saber científico

Agradeço à Dra. Ieda, por orientar, educar e transmitir sua experiência e sabedoria não só no campo científico, como na vida

À Daniela Teixeira e Mayari, parceria que possibilitou a concretização deste estudo, por tanto empenho e paciência na troca de conhecimento

Agradeço Dr. Henrique Tria pelo carinho, conversas e conselhos, sempre tão necessários e precisos

Agradeço Dr. Rui e Dra. Teresa, sempre presentes e prontos a ajudar

Agradeço a Simone, Juliana Kato e Ana Máximo, pelo convívio constante, carinho, ajuda e amizade.

Agradeço Dr. Flávio Tocci, Dra. Amanda, Ester, Patrícia Sakae, Valéria, Edna, Dr. Carlos Eduardo, Dra. Tatiana Helfeinstein, Dr. Jonas Amaral, Dra. Carolina França, Zenia, Darci, Cris e demais colegas do setor Lípides e Hipertensão, assim como aos residentes da cardiologia, pela ajuda no desenvolvimento e realização deste trabalho

Ao Kadu, secretário da pós-graduação, pelos conselhos, apoio e disponibilidade

Aos meus sogros, pelo carinho e compreensão por tantos momentos de ausência

Ao meu grande amigo Daniel Antunes, que já há 19 anos vibra nas alegrias, apoia as dificuldades e eleva a amizade ao mais alto patamar

Aos amigos e pares Walter, Rodrigo, Samia, Ralcyon, Carol e Vivi Nappi, Heather e Nádia, pois além de dezenas de “socorros”, tornam a vida muito mais alegre

Aos colegas do Hospital Alvarenga, pela compreensão e ajuda “na reta final”

Agradeço ao setor de ressonância do Instituto Dante Pazzanese e da EPM, em especial ao Dr. Ibraim, Dr. Gilberto e Deise Miyake

Agradeço a disciplina de cardiologia da UNIFESP pela oportunidade em ser pós-graduanda de tão importante instituição

A FAPESP e CNPq pelo apoio

Sumário

Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	xi
Lista de abreviaturas e siglas	xiii
Resumo	xiv
Abstract	xv
1 INTRODUÇÃO	
1.1 Epidemiologia da doença arterial coronariana e impacto do infarto agudo do miocárdio	1
1.2 O processo inflamatório na doença aterosclerótica e no infarto do miocárdio	4
1.3 As fases do infarto: enfoque histológico	6
1.4 Caracterização e marcadores de superfície dos linfócitos B e T	8
1.4.1 Receptores TLR4	9
1.4.2 Fenótipo dos linfócitos B1 em modelo experimental <i>versus</i> humano	9
1.4.3 Subpopulações de linfócitos B na aterosclerose	10
1.5 Citocinas e doença coronariana	13
1.6 Ressonância nuclear magnética no infarto miocárdio	15
1.7 Efeitos anti-inflamatórios da terapia hipolipemiante	16
2 OBJETIVOS	17
3 MÉTODOS	
3.1 Desenho e população do estudo	18
3.2 Amostras	18
3.3 Análise e separação das populações de linfócitos B e T por citometria de fluxo	19

3.4 Ensaio de ELISPOT para detecção e avaliação da síntese de IgM por células B1	24
3.5 ELISA para detecção de IgM plasmática	26
3.6 ELISA para determinação interleucinas plasmáticas	27
3.7 Detecção de citocinas no sobrenadante de cultura de linfócitos T	28
3.8 Ressonância nuclear magnética e realce tardio	29
3.9 Análise estatística	31
4 RESULTADOS	
4.1 Características dos pacientes	32
4.2 Características da cinecoronariografia	33
4.3 Análise comparativa entre pacientes com infarto do miocárdio e amostra de indivíduos controles	34
4.4 Comparação entre leucócitos totais e número absoluto de linfócitos nos pacientes com IAMCST no primeiro dia (D1) e após um mês (D30) do evento	36
4.5 Imunoglobulina M (IgM) plasmática e IgM produzida de forma espontânea pelo linfócito B1 no primeiro dia e após um mês do IAMCST	40
4.6 Correlações entre subpopulação de linfócito B e aumento da IgM plasmática	41
4.7 Níveis plasmáticos de interleucinas e citocinas dosadas no sobrenadante de cultura de linfócitos T dos pacientes com IAMCST em D1 e D30	42
4.8 Correlações entre as subpopulações de linfócitos e interleucinas plasmáticas	45

4.9 Correlação entre o subtipo B1CD11b+ e os linfócitos TCD4+	47
4.10 Correlações entre massa de infarto do ventrículo esquerdo e as subpopulações de linfócitos e IgM plasmática	47
4.11 Correlação entre massa de infarto do ventrículo esquerdo e IgM plasmática	49
4.12 Correlações entre parâmetros RNM cardíaca, proteína C-reativa de alta sensibilidade (PCRas) e interleucinas plasmáticas	49
4.13 Influência do braço de tratamento nas subpopulações de linfócitos	51
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÕES	56
7 REFERÊNCIAS	57
8 ANEXOS	

Lista de figuras

Figura 1. Dano miocárdico no infarto	7
Figura 2. Estudos experimentais em sua ordem cronológica sobre a relação entre aterosclerose e subpopulações de linfócitos B	11
Figura 3. Análise fenotípica de linfócitos B a partir de células mononucleares de sangue periférico por citometria de fluxo e separação celular das subpopulações	21
Figura 4. Análise de linfócitos T do sangue periférico por citometria de fluxo	22
Figura 5. Análise de pureza de separação de subpopulações de linfócitos B de sangue periférico por citometria de fluxo.	23
Figura 6. Detecção de células secretoras de IgM	25
Figura 7. Artéria culpada pelo IAMCST identificada por cineangiocoronariografia	33
Figura 8. Comparação entre a porcentagem de linfócitos TCD4 ⁺ entre controles e os pacientes com IAMCST	36
Figura 9. Frequência (%) dos linfócitos TCD4, TCD8, B2 e B1 no primeiro dia do IAMCST	38
Figura 10. Expressão do receptor TLR4 em linfócitos B2 dos pacientes IAMCST no primeiro dia e após 30 dias.	39
Figura 11. Expressão do receptor TLR4 em linfócitos B1 dos pacientes IAMCST no primeiro dia e após 30 dias	39
Figura 12. Dosagem de IgM plasmática dos pacientes IAMCST em D1 e D30	40
Figura 13. Dosagem de IgM secretada de forma espontânea por linfócitos B1 em pacientes com IAMCST	41

Figura 14. Concentração da interleucina 4 (IL-4) em pacientes IAMCST no primeiro dia e após 30 dias	43
Figura 15. Concentração da interleucina 10 (IL-10) em pacientes IAMCST no primeiro dia e após 30 dias	43
Figura 16. Concentração da interleucina 16 (IL-6) em pacientes IAMCST no primeiro dia e após 30 dias	44
Figura 17. Citocinas detectadas no sobrenadante de cultura de linfócitos T de pacientes IAMCST	45
Figura 18. Correlação do linfócito B1CD11b+ com massa infarto (g) do VE	48

Lista de tabelas

Tabela 1. Características basais dos grupos	32
Tabela 2. Comparação entre a distribuição das subpopulações de linfócitos no primeiro dia (D1) do IAMCST e após 30 dias (D30) com controles	35
Tabela 3. Distribuição das subpopulações de linfócitos dos pacientes com infarto do miocárdio no primeiro dia e após 30 dias	37
Tabela 4. Relação entre a imunoglobulina M (IgM) plasmática e o número de linfócitos B1 secretores de IgM de forma espontânea (ELISPOT) no primeiro dia (D1) e após 30 dias (D30) do IAMCST	42
Tabela 5. Relação entre linfócitos B1 com secreção espontânea de IgM (ELISPOT) e subtipos de linfócitos B1 (cels/mL) quantificados no primeiro dia (D1) e após 30 dias (D30) do IAMCST	42
Tabela 6. Avaliação da secreção de citocinas no sobrenadante de cultura de linfócitos T no primeiro e após 30 dias IAMCST	44
Tabela 7. Correlações entre linfócitos B e interleucinas plasmáticas no primeiro dia e após 30 dias após o IAMCST	46
Tabela 8. Correlações entre linfócitos T e interleucinas plasmáticas no primeiro dia e após 30 dias do IAMCST	47
Tabela 9. Relação linfócitos B1CD11b+ (cels/ml) e Linfócitos TCD4+ (cels/ml) quantificados no primeiro dia (D1) e após 30 dias (D30) após IAMCST	47
Tabela 10. Relação entre subpopulações de linfócitos no primeiro dia e após 30 dias após o IAMCST com a massa de infarto (g) pela RNM (D30)	48
Tabela 11. Relação entre imunoglobulina M plasmática no primeiro dia e após 30 dias após o IAMCST com fibrose miocárdica pela RNM (D30)	49
Tabela 12. Correlações entre FEVE e a massa infartada no primeiro dia e após 30 dias com as interleucinas plasmáticas PCRas	50

Tabela 13. Correlação entre a PCRas em D1 e interleucinas plasmáticas dos pacientes com IAMCST dosadas em D1 e em D30	50
Tabela 14. Influência do braço de tratamento nas subpopulações de linfócitos (cels/ml) após 30 dias de tratamento com sinvastatina+ ezetimiba/clopidogrel; sinvastatina+ezetimiba/ticagrelor; rosuvastatina/clopidogrel ou rosuvastatina/ticagrelor	51
Tabela 15. Influência do braço de tratamento nas subpopulações de linfócitos B TLR4+ (cels/ml) após 30 dias de tratamento com sinvastatina+ezetimiba/clopidogrel, sinvastatina+ezetimiba/ticagrelor, rosuvastatina/clopidogrel ou rosuvastatina/ticagrelor	51

Lista de abreviaturas e siglas

AVC	acidente vascular encefálico
CELS	células
BCR	B cell receptor
DAC	doença arterial coronariana
DVC	doença cardiovascular
D1	amostra primeiro dia de infarto miocárdio
D30	amostra 30º dia após o infarto miocárdio
DP	desvio padrão
FE	fração de ejeção
FEVE	fração ejeção ventrículo esquerdo
HDLc	high density lipoprotein cholesterol
HLA	human leukocyte antigen
IAMCST	infarto agudo do miocárdio com supradesnívelamento do segmento ST
ICP	intervenção coronária percutânea
IL	interleucina
Ig	imunoglobulina
IQ	interquartis
LDLc	low density lipoprotein cholesterol
Ox-LDL	oxidated low density protein
RNM	ressonância nuclear magnética
SCA	síndrome coronariana aguda
TLR	toll like receptor
VE	ventrículo esquerdo

Resumo

Introdução: A reperfusão precoce é recomendada universalmente para o tratamento de pacientes com infarto agudo do miocárdico com supradesnivelamento do segmento ST (IAMCST). Entretanto, apesar de rápida reperfusão com angioplastia primária ou química, alguns pacientes ainda apresentam grandes massas de fibrose miocárdica e portanto queda significativa da função ventricular. **Objetivo:** avaliar o papel da resposta inflamatória mediada pelos linfócitos, em especial a subpopulação de linfócitos B, na massa de infarto e no remodelamento ventricular após IAMCST. **Métodos:** amostras de sangue venoso foram coletadas no primeiro (D1) e trigésimo dia (D30) de pacientes com IAMCST (n=120). Todos os pacientes foram submetidos a estratégia fármaco-invasiva. A quantificação dos linfócitos B e T foi determinada por citometria de fluxo. A secreção espontânea de imunoglobulina M (IgM) pelos linfócitos B1, foi quantificada por ELISPOT. Os títulos de IgM total e níveis de interleucinas plasmáticas foram determinados por ELISA. A massa de infarto e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) foram estimadas por ressonância nuclear magnética cardíaca em D30. **Resultados:** houve queda no número absoluto (cels/mL) das subpopulações de linfócitos B1 e B2 em D30 (ambos $p < 0,001$), assim como para os linfócitos TCD4⁺ ($p = 0,049$). O número absoluto de linfócitos TCD8⁺ não se modificou ($p = 0,097$). O título de IgM foi maior aos 30 dias ($p < 0,001$), relacionado aos linfócitos B1 ($\rho = 0,227$; $p = 0,014$). Além disto, o subtipo B1CD11b⁺ em D1 apresentou associação positiva com a fibrose miocárdica ($\rho = 0,184$; $p = 0,045$). Houve aumento dos níveis das interleucinas (IL) 4 e 10 no trigésimo dia ($p = 0,013$ e $p < 0,001$ respectivamente), enquanto a concentração de IL-6 manteve-se estável ($p = 0,31$). O nível de IL-6 em D1 apresentou correlação positiva com a fibrose miocárdica ($\rho = 0,414$; $p < 0,001$) e associação negativa com a FEVE ($\rho = -0,38$; $p < 0,001$). **Conclusão:** mesmo após reperfusão precoce, a massa infartada final aos 30 dias e o remodelamento ventricular parecem estar relacionados com a resposta inflamatória.

Descritores: 1.Linfócitos B; 2.Infarto agudo do miocárdio; 3. Fibrose miocárdica; 4.Inflamação 5. Citocinas

Abstract

Introduction: Early reperfusion is universally recommended for the treatment of patients with ST segment elevation myocardial infarction (STEMI). However, despite early pharmacological thrombolysis or primary percutaneous intervention, some patients still present large amounts of myocardial necrosis and significant impairment of ventricular function. **Objective:** This study aimed to evaluate the role of inflammatory responses mediated by lymphocytes in the infarcted mass and ventricular remodeling after STEMI. **Methods:** Blood samples were collected in subjects with STEMI (n=120) in the first (D1) and 30th day (D30). All patients were submitted to pharmacological thrombolysis in the first 6 hours followed by coronary angiogram and percutaneous intervention if necessary in the first 24h of STEMI (pharmacoinvasive strategy). Flow Cytometry was used to quantify B and T lymphocytes subtypes followed by ELISPOT assay to determine spontaneously secreted IgM by B1 cells. Total plasma IgM and cytokine titers were also measured by ELISA. Cardiac MRI in the 30th day was used to estimate the myocardial fibrosis mass and left ventricular function. **Results:** A decrease in B lymphocytes subtypes count (cells/ml) was observed in D30 compared to D1 (all $p < 0.001$), and for TCD4⁺ ($p = 0.049$), but not for TCD8⁺ ($p = 0.097$). Higher IgM concentration was observed in D30 ($p < 0.001$) and it was mainly related to B1 cells ($\rho = 0.227$; $p = 0.014$). In addition, the frequency of B1CD11b⁺ cells in D1 was positively associated with the infarcted mass ($\rho = 0.184$; $p = 0.045$). There was an increase in interleukin (IL) 4 and IL10 titers at D30 ($p = 0.013$ and $p < 0.001$, respectively), while IL-6 titers remained unchanged ($p = 0.31$). Samples obtained in D1 showed that IL6 titers were associated with the infarcted mass ($\rho = 0.414$, $p < 0.001$) and also inversely related to left ventricular ejection fraction ($\rho = -0.38$; $p < 0.001$). **Conclusion:** Despite early reperfusion, final infarcted mass at D30 and ventricular remodeling seem partially related to the inflammatory responses.

Key-words: 1. B Lymphocytes; 2. Myocardial infarction; 3. Infarction mass; 4. inflammation; 5. Cytokines

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da doença arterial coronariana e impacto do infarto agudo do miocárdio

A doença aterosclerótica e suas complicações no Brasil e no mundo continuam um grave problema de saúde pública. Segundo dados fornecidos pelo Departamento de informática do sistema único de saúde- DATASUS, as doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte no país, causando aproximadamente 27,65% do total de óbitos.¹ Analisando-se a mortalidade específica por doenças do aparelho circulatório, as doenças isquêmicas do coração são responsáveis por 32% dos óbitos.² Dados recentes, publicados em 2016 por Ribeiro e colaboradores, mostram que o sistema público financiou 940.323 hospitalizações para DCV em 2012. No período de 2008 a 2012, as taxas de internações por insuficiência cardíaca congestiva e hipertensão arterial foram reduzidas, enquanto aquelas motivadas por angioplastia e infarto agudo do miocárdio (IAM) aumentaram.³

No mundo, dentre as dez principais causas de morte, as doenças isquêmicas do coração e o acidente vascular encefálico (AVC) lideram o “ranking”, ocupando o primeiro e segundo lugar respectivamente; perfazendo juntas, mais de 15,2 milhões de óbitos. Estas doenças permanecem as líderes globais de morte nos últimos 15 anos.⁴ Estudo realizado nos Estados Unidos de 1989 a 1998, 51% das mulheres e 41% dos homens com morte súbita cardíaca faleceram antes do primeiro contato médico. As síndromes coronarianas agudas foram responsáveis por 27% destas mortes.⁵

A maioria das mortes por IAM ocorre nas primeiras horas de manifestação da doença, sendo 40 a 65% na primeira hora e, aproximadamente, 80% nas primeiras 24 horas.⁶ Entre os sobreviventes 19% em média evoluirão com insuficiência cardíaca, importante causa internações e morbidade^{7,8}

A necrose miocárdica começa após alguns minutos da oclusão arterial e progride como uma “onda” do endocárdio para o epicárdio. Se a isquemia persiste por período prolongado, geralmente ocorre infarto transmural. ⁹ Entretanto, se o fluxo sanguíneo for restaurado, tecido miocárdico é salvo, diminuindo a extensão do infarto. Como a mortalidade e morbidade do IAM estão correlacionadas ao tamanho do

infarto, a rápida revascularização preserva a fração de ejeção (FE) e aumenta a sobrevivência.¹⁰ Assim, a reperfusão miocárdica deve ser imediata, pois a cada 30 minutos de retardo na reperfusão coronária, a mortalidade intra-hospitalar aumenta em 10%.¹¹

De acordo com a V Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia ⁶ sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio com supradesnível do segmento ST, em pacientes admitidos em hospitais com laboratório de hemodinâmica e disponibilidade para intervenção coronária percutânea (ICP) primária, esta deve ser realizada em intervalo não maior que 90 minutos do primeiro contato médico. Pacientes admitidos em instituições sem disponibilidade de ICP primária, poderão ser imediatamente transferidos para uma instituição com sua disponibilidade, se o tempo “primeiro contato médico-balão” previsto não for maior que 120 minutos. Caso contrário, devem receber a terapia fibrinolítica em até 30 minutos do primeiro contato médico.⁶

A estratégia fármaco-invasiva é a associação da fibrinólise farmacológica com ICP realizada dentro de 24 horas do tratamento, nos casos de reperfusão eficaz, ou imediata, nos casos sem critérios de reperfusão.⁶ Esta estratégia é bastante interessante no Brasil, uma vez que muitos dos serviços de pronto-atendimento não possuem serviço de hemodinâmica. O estudo STREAM¹², realizado em pacientes com IAMCST com até três horas de evolução, comparou de forma randomizada, a estratégia fármaco-invasiva na ambulância ou em ambiente hospitalar sem condições de realizar ICP, com a estratégia de transferir os pacientes para hospital com esta disponibilidade. Não houve diferença no desfecho primário analisado, que foi o composto de morte, choque, insuficiência cardíaca descompensada ou reinfarto em 30 dias. A reperfusão com fibrinolítico seguida por ICP é eficaz, embora cause maior taxa de sangramento intracraniano.¹² Após um ano de acompanhamento, a taxa de mortalidade permaneceu similar entre os grupos de terapia fármaco-invasiva ou angioplastia primária.¹³

Nas últimas quatro décadas, testemunhamos o acúmulo de evidências sobre o papel da inflamação na fisiopatologia da aterosclerose, que passou gradualmente de um modelo de deposição lipídica para o de doença inflamatória.¹⁴ A aterosclerose é um dos principais fatores de risco para doença cardiovascular e, mesmo com os avanços terapêuticos propiciados, por exemplo, por estatinas e antiagregantes plaquetários cada vez mais potentes; continuamos registrando altas taxas de suas complicações ou recorrências, como IAM e AVC. O conceito de que a inflamação está

presente em todas as fases da aterosclerose, desde seu início (com a disfunção endotelial), em sua progressão e até nas complicações finais- com a instabilização da placa e a formação de trombos- está consolidado, abrindo caminho para novos alvos terapêuticos.^{15,16}

1.2 O processo inflamatório na doença aterosclerótica e no infarto do miocárdio

A doença aterosclerótica é hoje considerada uma doença inflamatória crônica, não apenas local, mas também sistêmica.^{14,15} A presença de macrófagos em placas de artérias femorais de pacientes submetidos à reperfusão cirúrgica foi demonstrada em 1984 pelo Dr. Russel Ross, utilizando eletromicrografia.¹⁷ Jonasson, em 1985, demonstrou a presença de *human leukocyte antigen* (HLA) classe II na superfície de placas ateroscleróticas de biopsias de carótidas¹⁸, reforçando assim que as placas não são compostas apenas de gordura. As moléculas HLA classe II estão presentes em células apresentadoras de antígenos profissionais, como os macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. Estas células apresentam proteínas que foram fagocitadas ou endocitadas, sob forma de peptídeos ligados a estas moléculas¹⁹, estimulando os linfócitos TCD4.

Os fatores de risco tradicionais como hipertensão, tabagismo, dislipidemia, e diabetes, causam disfunção endotelial, traduzida por uma menor biodisponibilidade de óxido nítrico. O endotélio disfuncional aumenta a expressão de moléculas de adesão e citocinas, aumentando assim sua permeabilidade.^{20,21} Lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox) é captada na parede dos vasos, por receptores de varredura e seu “aprisionamento” na íntima vascular estimula a produção de mais substâncias quimiotáticas pelas células endoteliais, provocando a migração de monócitos e outras células do sistema imune para a íntima. A posterior fagocitose da LDLox forma células espumosas ou *foam cells* que são macrófagos altamente reativos.^{20,21} Estes últimos secretam metaloproteases, citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio. O ciclo de inflamação e quimiotaxia é criado, com migração de células musculares lisas, linfócitos T e B para o ateroma. A progressão da placa leva à apoptose e formação do núcleo necrótico, que pode então desestabilizar-se e romper, expondo substâncias que desencadeiam o processo de agregação das plaquetas e formação de trombos. O fluxo no vaso fica prejudicado ou obstruído, levando a manifestações clínicas de angina, infarto do miocárdio, AVC e doença arterial periférica.^{20,21}

O componente mecânico da obstrução vascular é abordado com a reperfusão química, cirúrgica ou com a angioplastia e colocação de stents, conjuntamente com o uso de medicamentos, como antiagregantes plaquetários e estatinas.²²

Já o componente inflamatório, na prática clínica atual, permite terapêutica muito limitada e baseados em estudos como o PROVE-IT e IMPROVE-IT, sabemos que manter o “status” inflamatório reduzido, traduzido por valores menores que 2 mg/L de proteína C reativa ultrassensível (PCRus) parece ser tão importante quanto reduções agressivas do colesterol LDL para uma sobrevida livre de eventos.²³⁻²⁵

Até muito recentemente, estudos que procuraram intervir diretamente na inflamação, realizados em sua maioria em pacientes em prevenção secundária, utilizaram classes de drogas anti-inflamatórias (colchicina)²⁶ e antimitóticas (metotrexato)²⁷, todas oferecidas de forma sistêmica. Os resultados foram positivos em alguns destes estudos, mas efeitos colaterais destes tratamentos foram descritos.

O estudo Cantos pode ser considerado um marco, pois foi desenhado para testar diretamente a hipótese inflamatória da aterosclerose, e, pela primeira vez, foi demonstrado que reduzir a inflamação vascular de forma isolada, sem modificar os níveis lipídicos, diminui eventos cardiovasculares, embora tenha havido pequeno aumento de infecções em geral e queda de alguns parâmetros hematológicos.¹⁶

Entramos na era da medicina molecular e buscar formas de abordar o processo inflamatório de forma mais seletiva, seria identificar as células e respectivas interleucinas que modulam as várias fases da doença isquêmica, seja no seu gatilho ou cicatrização, com objetivo de desenvolver terapias que ajam em pontos específicos. Estudos experimentais foram realizados com foco nos macrófagos, neutrófilos²⁸ e em subpopulações de células T²⁹ porém pouco se sabe sobre os linfócitos B e suas subpopulações na fase aguda do infarto

1.3 As fases do infarto: enfoque histológico

A aterosclerose é responsável por quase totalidade das síndromes coronárias agudas (SCA), ficando uma pequena porcentagem em razão de outras etiologias tais como espasmo arterial, trombofilias, embolização ou desproporção entre demanda e oferta miocárdica de oxigênio.³⁰

O processo de formação da placa aterosclerótica já foi descrito no item 1.2 e, uma vez formadas, estas podem desestabilizar-se por diversos fatores, como a diminuição da capa fibrosa, hemorragias no interior da placa ou aumento da pressão de arrasto hemodinâmico, que facilitam seu rompimento ou perda de endotélio. Em ambas as situações, material interno entra em contato com a corrente sanguínea, desencadeando processo de formação de trombos.³⁰

Esta é considerada a primeira fase do infarto, dita inflamatória, que dura de minutos a quatro dias, caracterizada pela formação de fibrina, plaquetas e hemácias adjacente ao ponto de exposição da matriz. Plaquetas ativadas liberam proteínas de adesão e fatores de crescimento que atraem neutrófilos, principal célula presente nesta fase, e também macrófagos que, por fagocitose, farão a depuração dos debris celulares e outras substâncias presentes no tecido lesado.²²

A próxima fase, proliferativa, dura de 4 horas a 14 dias e é caracterizada pela regulação da resposta inflamatória, alcançada pela mudança das células para um perfil anti-inflamatório, ou seja, citocinas como IL-10 e fatores de crescimento são secretados por macrófagos e linfócitos, que favorecem a neovascularização e produção de matriz extracelular.^{22,31}

A fase de maturação, dominante a partir de 14 dias, observa-se a resolução da cicatriz do IAM. A matriz torna-se mais resistente, pela deposição do colágeno, apoptose de miofibroblastos e inibição da angiogênese.²²

As fases do infarto não possuem um período tão fixo e podem ser exacerbadas ou suprimidas, de acordo com a resposta celular e inflamatória do indivíduo.³¹

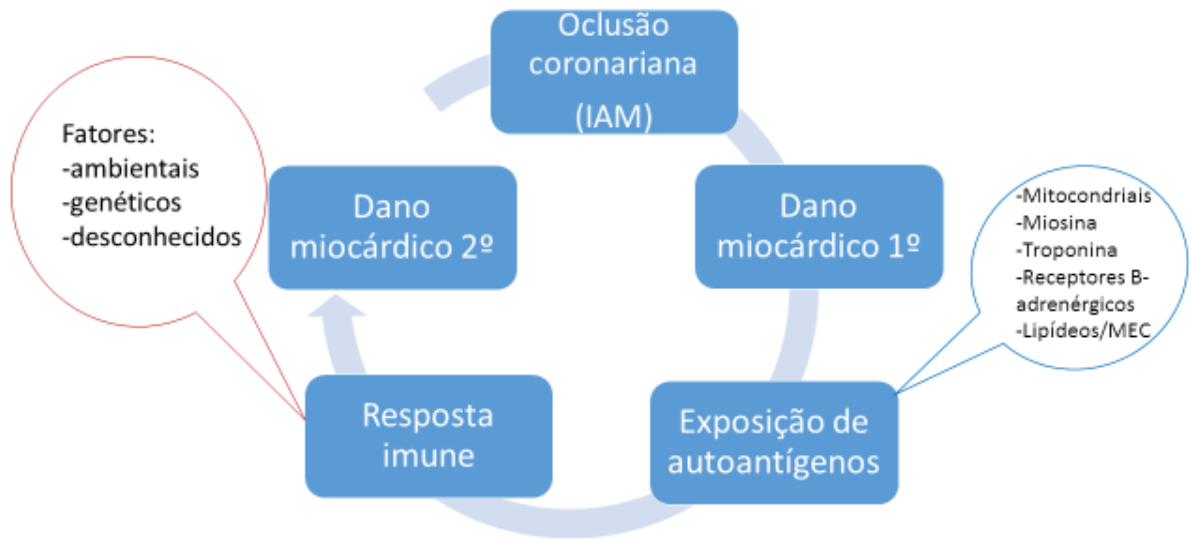


Figura 1. Dano miocárdico no infarto. Fonte: *Adaptado de Kaya Z et al.*³² Após oclusão da artéria coronária, a hipóxia gera o primeiro dano miocárdico, que leva à exposição de autoantígenos, que por sua vez, desencadeará uma resposta imune. Esta última é influenciada por uma série de fatores externos e do próprio indivíduo, sendo responsável por uma segunda lesão no tecido cardíaco.

1.4 Caracterização e marcadores de superfície dos linfócitos B e T

Os linfócitos B são células diferenciadas da linhagem linfóide, sofrem o processo de maturação na medula óssea, e são conhecidos por seu papel na imunidade mediada por anticorpos ou imunidade humoral.³³ Ao saírem da medula óssea, expressam em sua membrana moléculas de superfície, como o receptor de antígenos das células B ou “B cell receptor” (BCR), as moléculas CD19 e CD20, que são marcadores utilizados para identificação dessas células.³⁴

Os linfócitos B clássicos, ou B2, migram para órgãos linfóides secundários, como baço e linfonodos, onde entrarão em contato com antígenos que, caso sejam proteínas, dependerão do auxílio dos linfócitos T para proliferarem e transformarem-se em plasmócitos, que são células especializadas em secretar anticorpos, ou ainda formarem células de memória. Já quando reconhecem antígenos não-proteicos, como polissacarídeos e lipídeos, não dependem da cooperação dos linfócitos T, são ativados e entram em proliferação por concentração de moléculas do BCR ou via *toll like receptors* (TLR).³⁴

O estágio de maturação dos linfócitos B é marcado pela expressão específica de proteínas de membrana e imunoglobulinas, que servem como marcadores fenotípicos. Linfócitos B2 *naïve*, ou seja, aqueles que em sua maioria não tiveram contato com antígenos, são caracterizados pelo fenótipo CD20⁺CD27⁻CD43⁻.^{35,36} Esta é a primeira célula B clássica madura no sangue e a ativação destas células por proteínas inicia um processo de proliferação e diferenciação em que ocorrerá transcrição gênica para síntese de imunoglobulinas. Em um primeiro contato com o antígeno, em geral, o anticorpo a ser produzido é do isotipo M (IgM). Nos contatos subsequentes pode ocorrer o que é chamado de *switch* de classe que depende da interação entre moléculas de superfície do linfócito B (CD40) e do linfócito T (CD40L) e citocinas produzidas por estas células que levarão a um outro rearranjo gênico, com troca de isotipo de imunoglobulina. Deixam de secretar IgM e passam a produzir IgA, IgE ou IgG, anticorpos nos quais a especificidade ao antígeno continua a mesma porém com alta afinidade. Neste processo diferenciam-se em plasmócitos e células de memória (CD20⁺CD27⁺ CD43⁻).^{33,35-37}

Caso a ativação do linfócito B ocorra na ausência dos linfócitos T, e portanto por meio de antígenos não-proteicos, o anticorpo produzido será essencialmente IgM, de baixa afinidade.³³

Um exemplo de síntese de anticorpos com resposta independente dos linfócitos T são os anticorpos naturais, que são imunoglobulinas já presentes na circulação de indivíduos normais, produzidos aparentemente sem exposição antigênica. O sistema ABO sanguíneo é um exemplo. Acredita-se que sejam produzidos por linfócitos peritoneais, chamados células B1.³³

Já os linfócitos T passam pelo processo de seleção e maturação no timo e são definidos pela molécula de superfície CD3. Neste estudo, analisaremos os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. De forma simplificada, os primeiros são ativadores celulares, chamados de auxiliares, enquanto os segundos são citotóxicos, levando à apoptose de células neoplásicas ou comprometidas por vírus.³³

1.4.1 Receptores TLR4

Os receptores *toll-like* são uma família de onze receptores que reconhecem “padrões moleculares” de patógenos ou dano celular. Estão ligados a doenças cardiovasculares porque iniciam a resposta inflamatória de células imunes e não-imunes.^{34,38}

Tradicionalmente são ligados aos macrófagos e células espumosas, mas podem ser expressos em diferentes populações celulares principalmente as envolvidas com a resposta imune inata e adquirida, como os linfócitos B, que podem ser ativados de forma direta por esta via, causando proliferação e secreção de anticorpos, sem a necessidade das células T ou dendríticas.^{34,38} Os receptores TLR4 são capazes de se ligar a lipopolissacarídeos e outros ligantes endógenos.³⁸

1.4.2 Fenótipo dos linfócitos B1 em modelo experimental *versus* humano

Os linfócitos B clássicos, ou B2 foram descritos no item 1.3. São células produzidas na medula óssea, presentes no baço e linfonodos, responsáveis em grande parte pela imunidade humoral.

Já os linfócitos B1, são bem caracterizados em modelos experimentais e seu fenótipo humano ainda gera controvérsias. Linfócitos B1 de camundongos são autorrenováveis, produzem espontaneamente imunoglobulina M (IgM) e interleucina 10 (IL-10), possuindo características tanto da imunidade inata quanto humoral.^{34,39}

Tem sido proposto que possuam uma linhagem diferente dos linfócitos B clássicos, sendo remanescentes da hematopoese fetal. Sua localização também difere dos primeiros, estando presentes principalmente nas cavidades pleural e abdominal.^{34,39} Seu fenótipo, na maioria dos estudos em humanos, é definido pela presença da molécula de superfície CD5, assim como descrito experimentalmente.³⁴ Exemplos deste fato são estudos em pacientes com dermatite atópica, retocolite ulcerativa e doenças autoimunes, referindo o fenótipo CD19⁺CD5⁺ para as células B1.⁴⁰⁻⁴² Entretanto, as células B CD5⁺ em humanos, não são específicas dos linfócitos B1.^{43,44}

Sendo assim, Griffin e colaboradores propuseram em 2011, um fenótipo B1 humano: CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD70⁻⁴³, assim como duas subpopulações de linfócitos B1, baseado na presença ou ausência de CD11b. Estes subtipos diferem em sua capacidade funcional.⁴⁵

A célula humana identificada como B1, mantém funções similares aquelas descritas em camundongos: a autorrenovação, produção espontânea de IgM e de IL-10.⁴³

Este fenótipo foi questionado por alguns grupos, sugerindo-se tratar-se de *doublets* de células T, plasmócitos ou até mesmo macrófagos, o que foi refutado por meio de estudos gênicos pelo grupo proponente⁴⁶ e posteriormente também afastado por outros pesquisadores.³⁶

1.4.3 Subpopulações de linfócitos B na aterosclerose

A influência das células B nas doenças cardiovasculares não se resume à sua produção de anticorpos, mas também pela modulação da resposta imune, através das citocinas, apresentação de antígenos e formação de tecido linfoide.^{47,48}

O papel dos linfócitos B na aterosclerose ainda não foi totalmente esclarecido, uma vez que a depleção destas células em camundongos, ora acelera, ora diminui o desenvolvimento das placas ateroscleróticas.

Postulava-se que os linfócitos B exerciam papel ateroprotetor, já que a

esplenectomia ou a deficiência de células B aceleraram o processo aterosclerótico em modelos animais.^{49,50}

Ait-Oufella e colaboradores, em 2010, desafiaram este papel, demonstrando que a depleção de células B com anticorpos monoclonais diminuía o desenvolvimento de placas ateroscleróticas em camundongos propensos a aterogênese.⁵¹

Além disto, a depleção de células B em camundongos logo após IAM, aumentou a função do ventrículo esquerdo e diminuiu a área de infarto. O mesmo grupo analisou banco de dados de mais de mil pacientes com IAM e encontraram correlação positiva em maiores tercís de BAAF (*B cell activation factor*) e a detecção de CCL7 (*chemokine C-C motif_ ligand 7*, uma quimiocina relacionada a mobilização de monócitos), com um pior prognóstico - morte e reinfarto, expondo uma resposta contraditória.⁵²

Kyaw e colaboradores, esclareceram o paradoxo, demonstrando que em camundongos ApoE^{-/-} depletados de linfócitos B com uso de anticorpo monoclonal anti-CD20, a transferência de concentrado de células B1 atenuava o processo aterosclerótico enquanto a de células B2 aumentava o desenvolvimento das placas.⁵³

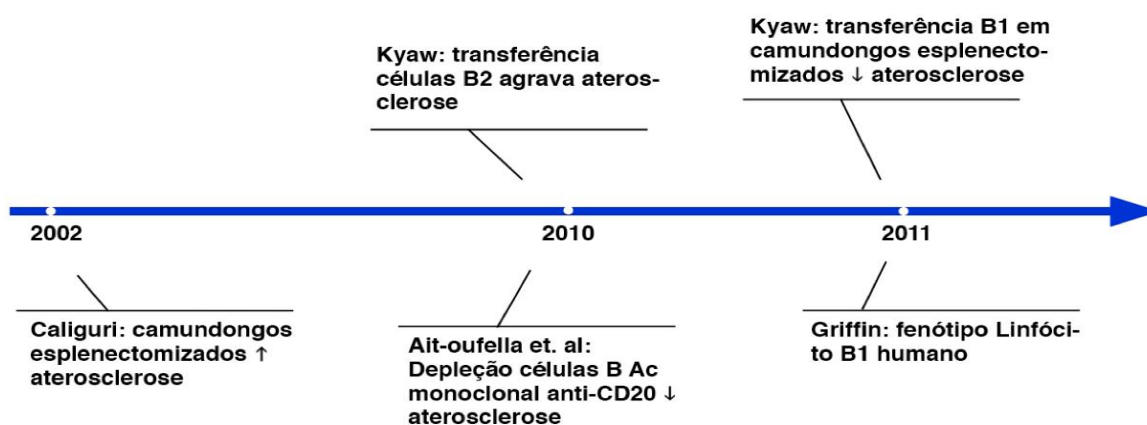


Figura 2. Estudos experimentais em sua ordem cronológica sobre relação entre aterosclerose e subpopulações de linfócitos B Fonte: Aguirre AC, et al. XXXVI Congresso Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo-SOCESP, 2015

Em humanos, biopsias realizadas em aortas de pacientes com doença aterosclerótica avançada, que foram submetidos à cirurgia cardíaca, comprovaram a presença de células inflamatórias na adventícia destes vasos, principalmente linfócitos B, que estavam organizados de forma muito semelhante ao tecido linfoide associado a mucosas (MALT).⁵⁴

Estudos em humanos que contemplam células B1, como já citado anteriormente, foram realizados em doenças inflamatórias como retocolite ulcerativa, lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide e também com pacientes atópicos, todos relacionando a menor presença destas células com menor tolerância aos antígenos.⁴⁰⁻

42

As revisões atuais sobre linfócitos B e aterosclerose, baseadas em muitos dos estudos aqui citados, sugerem que células B1, por meio da produção de IgM, seriam antiaterogênicas; enquanto linfócitos B2, pró-aterogênicos.⁵⁵

Os linfócitos B clássicos ou B2, presentes principalmente na adventícia adjacente às placas, poderiam influenciar sua estabilidade, além da ativação dos linfócitos T, pela produção de citocinas e anticorpos, que chegariam até a íntima por meio de canalículos.⁵⁴ Outro mecanismo recentemente descrito sobre a influência dos linfócitos B no infarto do miocárdio seria pela capacidade de mobilização de monócitos LY6C⁺ para a área de infarto, através de secreção de quimiocina CCL7, também chamada de MCP-3 (*monocyte chemoattractant proteins*).⁵² O subtipo de monócitos LY6C⁺ possuem características pró-inflamatórias, e são recrutados para sítios de inflamação pela quimioatração de MCP-3/CCL7, ligante do receptor CCR2 (C-C chemokine receptor type 2) ⁵⁶

A IgM polirreativa secretada pelos linfócitos B1 tem grande afinidade por antígenos gerados na oxidação, como a LDL oxidada, e também por partículas apoptóticas, e poderiam realizar o clareamento destas moléculas, conferindo maior estabilidade à placa.^{57,58}

Griffin⁴⁵ estabeleceu em humanos dois subtipos distintos de linfócitos B1, aqueles CD11b⁺ ou CD11b⁻. A molécula CD11b é uma integrina de membrana, normalmente considerada um marcador de célula mieloide. Se ligada ao complemento, produz citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e TGF- β (*transforming growth factor beta*). Em modelo experimental, é capaz de regular negativamente o BCR pela interação com a glicoproteína CD22; sendo assim crítico para a autotolerância. Células B de camundongos *Knockout* para CD11b proliferam mais e morrem menos após estímulo BCR.⁵⁹ Os linfócitos B1CD11b⁺ provocam expansão de linfócitos T e são capazes de maior produção de IgM polirreativa.⁴⁵

Sendo assim, os linfócitos B possuem um papel dual na aterosclerose, pouco estudado e descrito em pacientes com doença coronariana manifesta.

1.5 Citocinas e doença coronariana

As citocinas exibem um papel crucial na injúria miocárdica, uma vez que modulam a resposta de diversos tipos celulares como macrófagos, neutrófilos e linfócitos, além de fibroblastos e do próprio endotélio.²²

Neste trabalho, enfocaremos dois conjuntos de citocinas secretadas por ambos linfócitos, T e B, que interagem de forma muito próxima e influenciam de forma mútua em suas funções biológicas. As mesmas citocinas, possuem múltiplas funções.

O primeiro conjunto, secretado especialmente em linfócitos Th1 (subtipo de linfócitos TCD4⁺, caracterizado pela ativação de macrófagos¹⁹), é formado por três substâncias reconhecidamente pró- inflamatórias: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ), interleucina 6 (IL-6). O primeiro está ligado a disfunção endotelial, pela indução de espécies reativas de oxigênio e menor disponibilidade de nitrogênio.⁶⁰ Já IFN- γ , quando usado para estimular monócitos de pacientes com SCA, foi associado a maior atividade de metaloprotease-9 (MMP-9) ⁶¹, importante para degradação de matriz extracelular, com possível papel na desestabilização de placas. Estudo que quantificou TNF- α , IL-6 e PCR em pacientes IAMCST após ICP, mostrou correlação positiva do TNF- α com disfunção segmentar de parede do VE, tamanho do infarto e defeitos de perfusão.⁶² Estudo com 1028 pacientes admitidos com IAMCST, apresentou correlação inversa da IL-6 basal com fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE). Concentrações mais elevadas de seu receptor no sangue (*sIL-6 receptor*) deste mesmo grupo de pacientes, após seguimento de 4,6 anos, foi capaz de prever eventos cardiovasculares.

Curiosamente, o nível *per se* da interleucina-6 não foi capaz de predizer eventos.^{63,64} Em publicação derivada da análise de IL-6 plasmática de parte dos pacientes do estudo Cantos¹⁶, demonstrou que o grupo de indivíduos em tratamento com canakinumab que atingiu níveis de IL-6 abaixo de 1.65 ng/L, apresentou 32% de redução de eventos cardiovasculares se comparado com o grupo placebo, enquanto aqueles pacientes com níveis iguais ou superiores a este valor, não obtiveram reduções significativas em nenhum dos desfechos.⁶⁵

O segundo conjunto, composto pelas interleucinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4, é ligado ao deslocamento da resposta imune para a reparação, polarizando as

células para um fenótipo “reparador”.^{22,31} Estas interleucinas induzem a polarização dos linfócitos TCD4⁺ em Th2 e macrófagos em M2, que são reconhecidamente envolvidos com resolução do processo inflamatório.⁶⁶

A IL-10 basal em coorte de 930 pacientes, não foi capaz de prever eventos cardiovasculares em seguimento de 10 anos.⁶⁷ Por outro lado, pacientes com IAMCST em que foram identificadas altas concentrações séricas de IL-10, simultaneamente com a de IL-6, apresentaram maior risco de disfunção sistólica e morte após seis meses do IAMCST.⁶⁸ Na mesma linha, em estudo com 3634 pacientes com SCA e seguimento de 1 ano, os pacientes classificados no quartil superior de concentração de IL-10 morreram mais, embora a significância seja perdida se o modelo for ajustado para concentrações de PCR e IL-6.⁶⁹ Entretanto, em outro estudo com pacientes infartados, foi demonstrado correlação negativa da IL-10 com diâmetro diastólico final do VE 30 dias após IAM.⁷⁰

Já a IL-4, em estudo experimental de modelo de hipertensão com infusão de angiotensina II em camundongos *wild type* e IL-4^{-/-}, a ausência de produção de IL-4 foi associada a menor fibrose miocárdica, polarização do linfócito T para perfil Th1, com maior produção de IFN- γ no tecido miocárdico que, em conjunto, impediram o desenvolvimento de miocardiopatia dilatada no animal modificado geneticamente.⁶⁶ Apesar disto, estudo clínico que comparou pacientes infartados divididos em 2 grupos, com FE maior ou menor que 30%, concentrações menores de IL-4 foram detectadas nos pacientes com menor FE.⁷¹

A interleucina 2 é ligada a proliferação celular. Em modelo experimental de infarto, a administração de um complexo IL-2/anti-IL-2 diminuiu a fibrose miocárdica, a apoptose de cardiomiócitos, o nível de citocinas inflamatórias e melhorou a fração de ejeção VE.⁷² Pacientes com doença coronariana estável, em uso de trimetazidina, medicamento antianginoso com efeitos metabólicos, tiveram níveis de IL-2 diminuídos após 3 meses de tratamento.⁷³

Analisando-se os dados literatura, percebemos que as funções assumidas pelas citocinas em estudos experimentais ou *in vitro*, não tem correspondência exata nos estudos clínicos, muito provavelmente devido a interação entre várias delas, além de outros fatores como o “status” inflamatório do indivíduo, o uso de medicamentos e a genética.

1.6 Ressonância nuclear magnética no infarto miocárdio

A ressonância nuclear magnética (RNM) cardíaca pode ser utilizada em pacientes com IAM visando descartar a doença isquêmica, estudar a viabilidade miocárdica anteriormente a revascularização, delinear prognóstico, planejar terapia de ressincronização ou guiar terapêutica adequada.⁷⁴

Diretrizes atuais recomendam estudo por imagem para quantificação da fração ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) e possíveis complicações após IAMCST, sendo a ecocardiografia a técnica mais rotineiramente utilizada.⁶ A fração de ejeção é fator prognóstico importante para desfechos clínicos e este parâmetro tem correlação moderada entre a ecocardiografia e RNM cardíaca ($r=0.51$ $p<0,001$). Em estudo de 2012, a FEVE quantificada pela RNM cardíaca foi capaz de reclassificar aproximadamente 37% dos pacientes para nível menos severo de disfunção de VE⁷⁵, mas devido a seu maior custo, o uso consciente do método pode estar em empregá-lo em pacientes de risco potencial mais alto, ou seja disfunção VE moderada a grave.⁷⁶

A área de fibrose miocárdica é delimitada com alta fidelidade pelo realce tardio com gadolínio, e sua extensão está ligada a pior prognóstico.⁷⁷ A técnica também é útil para esclarecer a etiologia do evento em casos de pacientes IAM e cineangiocoronariografia sem lesões obstrutivas.⁷⁸ Um estudo negativo feito com RNM cardíaca com estresse indica um bom prognóstico e está associado com risco muito baixo de morte cardiovascular,⁷⁹ embora esteja disponível no Brasil apenas em alguns centros de referência.

No presente estudo, o método com estresse foi utilizado para quantificação da massa de infarto, fração de ejeção e como fonte complementar na condução ambulatorial dos pacientes.

1.7 Efeitos anti-inflamatórios da terapia hipolipemiante

As estatinas, além de sua capacidade de diminuir os níveis de colesterol pela inibição da 3-hidroxi-metilglutaril coenzima A (HMG-coA) redutase, possuem também características pleiotróficas, nome dado às propriedades destes fármacos além do efeito hipolipemiante.^{80,81}

O efeito antitrombogênico deve-se à inibição da cascata de produção de colesterol, que também diminui a formação de mevalonato, que interfere na cascata de precursores de agentes trombogênicos, como fator tecidual e PAI-1, que então também serão formados em menor quantidade.⁸⁰

Já os efeitos anti-inflamatórios são atribuídos à interferência causada na cascata de intermediários de isoprenilação de proteínas sinalizadoras intracelulares como RAS e Rho.^{80,82} Além disso, diversos estudos prospectivos com estatinas demonstraram que níveis menores de PCRus, um marcador inespecífico da inflamação, estão associados a melhores desfechos.⁸³

A ezetimiba, fármaco também hipolipemiante, mas pela diminuição de absorção de colesterol também parece ter características favoráveis, pois pacientes do estudo IMPROVE-IT em uso da mesma, tiveram maior sobrevida livre de eventos e menores níveis de PCRus.²⁵

Já a imunodulação pode ser exemplificada em revisão recente sobre a influência das estatinas no receptor TLR4, que, como descrito item 1.4.1, está ligado de forma importante às doenças cardiovasculares.⁸²

Assim, os benefícios das estatinas estão muito além de seu poder hipolipemiante.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

Estudar a participação das subpopulações de linfócitos B na evolução do infarto agudo do miocárdio com supradesnivelamento do segmento ST, no primeiro dia e após um mês do evento.

Objetivos específicos:

- Correlacionar os subtipos de linfócitos com fibrose miocárdica examinada por ressonância nuclear magnética cardíaca
- Avaliar a correlação entre subpopulações de linfócitos e concentrações de interleucinas circulantes
- Analisar a correlação entre imunoglobulina M com a fibrose miocárdica e função ventricular esquerda avaliados por ressonância nuclear magnética cardíaca
- Verificar a influência dos diferentes tratamentos com estatinas com modificações no perfil de subpopulações de linfócitos
- Avaliar o perfil de citocinas secretadas pelos linfócitos T

3 MÉTODOS

3.1 Desenho e população do estudo

Pacientes do estudo BATTLE-AMI⁸⁴ (n=120) admitidos no Hospital São Paulo-UNIFESP com diagnóstico de infarto agudo do miocárdio com supradesnivelamento do segmento ST-T tratados sob estratégia fármaco-invasiva, foram reperfundidos quimicamente com tenecteplase dentro das primeiras seis horas de início dos sintomas e realizaram cineangiocoronariografia dentro das primeiras 24 horas, e avaliados nas primeiras 24 horas e 30 dias após o evento. Os pacientes foram randomizados por sistema computadorizado central em razão 1:1 em quatro braços de tratamento: clopidogrel 75 mg + sinvastatina 40 mg combinada a ezetimiba 10 mg; clopidogrel 75mg + rosuvastatina 20mg; ticagrelor 180mg + sinvastatina 40 mg combinada a ezetimiba 10 mg; ticagrelor 180mg + rosuvastatina 20 mg.

Foram excluídos pacientes instáveis clinicamente, com infarto prévio, doença autoimune diagnosticada e/ou uso de imunossupressores, neoplasia em tratamento e/ou com diagnóstico nos últimos cinco anos, grávidas e pacientes com alteração no exame físico que sugerisse infecção ativa.

Termo de consentimento livre e esclarecido previamente aprovado pelo comitê de ética local foi lido e assinado por todos os pacientes (TCLE_versao3_21_06_2017-Anexo 1).

Um total de 20 pacientes sem doença coronariana foram utilizados como controles para comparação e melhor entendimento dos parâmetros imunes.

3.2 Amostras

Foram coletadas amostras de 30 ml de sangue venoso em tubo heparinizado e 3 ml em tubos EDTA que foram prontamente analisadas no laboratório da Disciplina de Imunologia (departamento de Micro, Imuno e Parasitologia) da EPM/Unifesp, para a realização de citometria e cultura celular, e no laboratório Central do Hospital São Paulo para hemograma completo e bioquímica.

Os tubos de sangue foram centrifugados a 448 g, por 10 minutos, à temperatura ambiente. Alíquotas de plasma (1 mL) foram armazenadas a -20°C, para determinação dos títulos de IgM e interleucinas.

Após a obtenção de alíquota de plasma, ao volume total de sangue coletado foi adicionado o mesmo volume de PBS 1X, à temperatura ambiente, totalizando aproximadamente 40 mL. Após homogeneização, este volume foi transferido lentamente para dois tubos contendo 10 mL de Ficoll-Paque. Após centrifugação a 592 g, por 40 minutos a 20° C, foi possível observar a formação de uma nuvem de células mononucleares na interface entre a fase aquosa e a fase de Ficoll, enquanto as hemácias se concentraram no fundo dos tubos. O anel leucocitário foi totalmente coletado, transferido para outro tubo e submetido a duas lavagens com PBS 1X, com centrifugações a 324 g, por 10 minutos a 20°C. Após a última centrifugação, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (R10), e submetidas à contagem em azul de trypan, para ajuste de concentração e avaliação da viabilidade.

Em seguida, foram centrifugadas a 324 g, por cinco minutos, à 4°C, e ressuspensas em meio de congelamento, constituído de 90% de soro fetal bovino e 10% de DMSO, de forma a manter a proporção de 1×10^7 células por *vial* de congelamento. As células foram armazenadas por 1 semana a -80°C e então transferidas para nitrogênio líquido, onde permaneceram até o momento das avaliações.

3.3. Análise e separação das populações de linfócitos B e T por citometria de fluxo

As células armazenadas foram rapidamente descongeladas, diluídas em meio RPMI e centrifugadas para retirar o excesso da solução de congelamento. Após serem ressuspensas em meio R10, foram contadas em azul de trypan para avaliação da viabilidade e determinação da concentração celular. Para a avaliação de linfócitos T, 5×10^5 células foram utilizadas, enquanto o restante das células foi usado para a avaliação dos linfócitos B, bem como para a separação celular. De acordo com a concentração celular, seguiu-se incubação por 30 minutos, a 4°C, na ausência da luz, com os seguintes anticorpos, para cada população a ser analisada:

a) Linfócito T: anti-CD3 conjugado a APC; anti-CD4 conjugado a PE-Cy5.5; e anti-CD8 conjugado a APC-eFluor 780 (eBioscience), sendo possível definir as populações de linfócitos TCD4⁺ (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻) e TCD8⁺ (CD3⁺ CD4⁻ CD8⁺).

b) Linfócitos B: anti-CD20 conjugado a APC-H7; anti-CD3 conjugado a PE; anti-CD19 conjugado a BV510; anti-CD27 conjugado a APC; e anti-CD43 conjugado a PE-Cy7, sendo possível definir as populações de linfócitos B naïve (CD3⁻ CD20⁺ CD19⁺ CD27⁻ CD43⁻), B de memória (CD3⁻ CD20⁺ CD19⁺ CD27⁺ CD43⁻) e B-1 (CD3⁻ CD20⁺ CD19⁺ CD27⁺ CD43⁺)¹⁵. Além disso, acrescentou-se o anticorpo anti-TLR4 conjugado a FITC (eBioscience), para detecção da expressão deste marcador nas populações de linfócitos B.

Após lavagem com PBS 1X e centrifugação a 252 g, por cinco minutos, à 4°C, as células foram ressuspensas em PBS 1X, para serem, então, adquiridas e submetidas à separação das populações de linfócitos B. A aquisição e a separação celular foram realizadas em citômetro de fluxo *Cell Sorter FACS AriaII*TM (BD), enquanto as análises de imunofenotipagem foram geradas com o auxílio do software FlowJo (versão 9.7.6, Tree Star, CA). As populações de células separadas por citometria de fluxo e utilizadas em etapas posteriores foram as populações de linfócitos B (B naïve, B de memória e B1, como definidas acima) e de linfócitos T totais (CD3⁺ CD19⁻).

Os anticorpos monoclonais específicos para as moléculas de superfície foram previamente titulados e a quantidade ideal de uso foi definida.

Para realização de compensação, foram utilizadas CompBeads (BD) marcadas com cada anticorpo, na mesma concentração pré-definida.

A análise dos linfócitos B1 e B2 nas amostras está esquematizada na figura 3, e a análise dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ na figura 4.

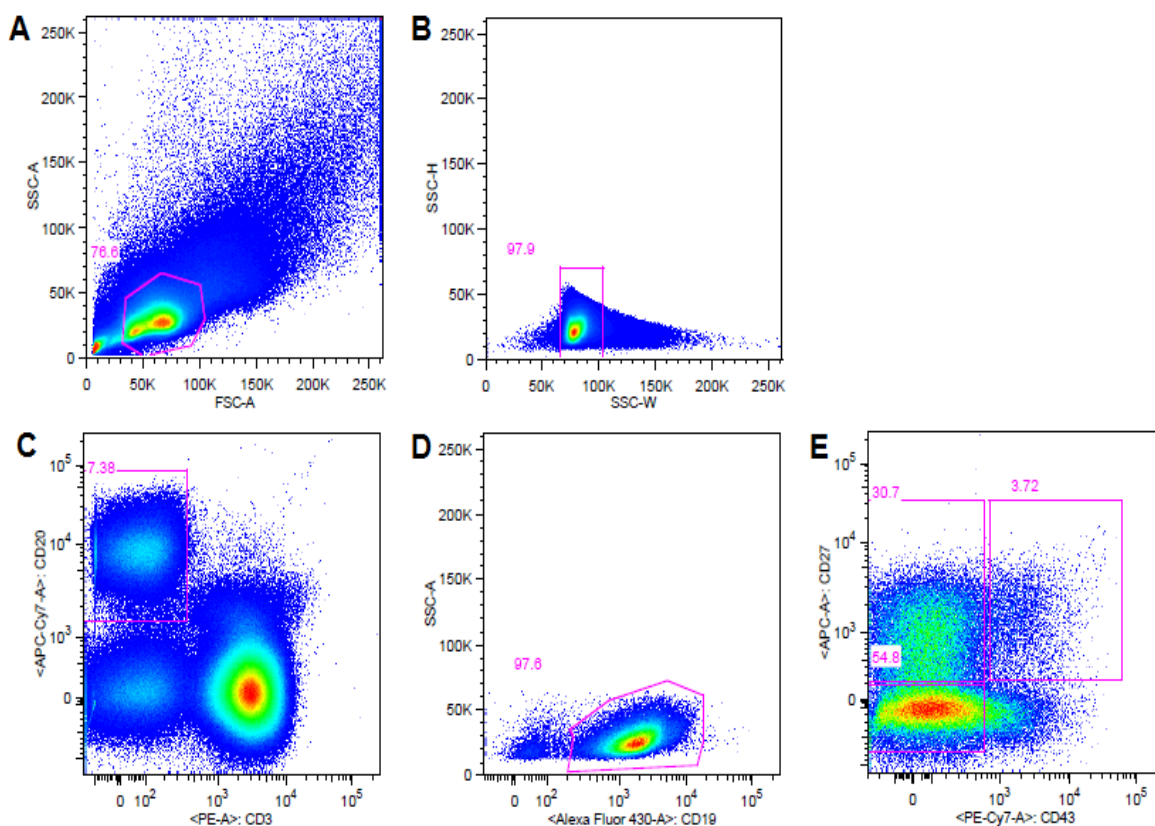


Figura 3: Análise fenotípica de linfócitos B a partir de células mononucleares de sangue periférico por citometria de fluxo e separação celular das subpopulações. Em um gráfico de tamanho por granulosidade (A, FSC-A x SSC-A), os linfócitos foram definidos, e analisados sob a forma de *singlets* (B, SSC-W x SSC-H), ou seja, excluindo os agregados celulares. Excluindo as células CD3⁺ e selecionando as células CD20⁺ (C, CD3 x CD20) e CD19⁺ (D, SSC x CD19), são definidas as subpopulações de células B (E, CD43 x CD27) como células naïve (CD27⁻ CD43⁻), células de memória (CD27⁺ CD43⁻) e células B-1 (CD27⁺ CD43⁺). Este esquema é representativo de todas as amostras analisadas. Foram adquiridos 2.000.000 de eventos totais.

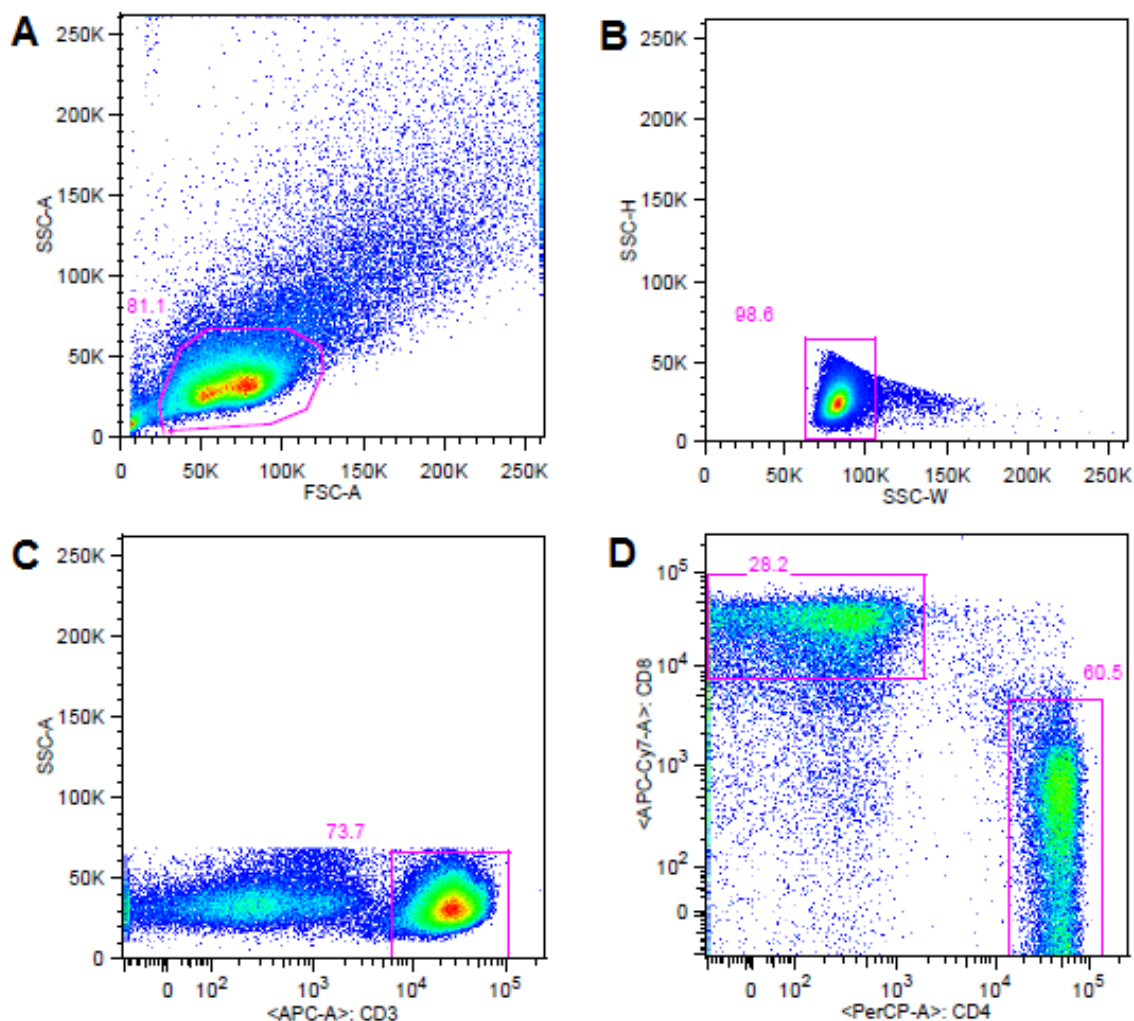


Figura 4. Análise de linfócitos T do sangue periférico por citometria de fluxo. Em um gráfico de tamanho por granulosidade (A, FSC-A x SSC-A), os linfócitos foram definidos e analisados sob a forma de *singlets* (B, SSC-W x SSC-H), ou seja, excluindo os agregados celulares. Dentre as células CD3⁺ (C, CD3 x SSC-A), foram definidas as células exclusivamente CD4⁺ e CD8⁺ (D, CD4 x CD8). Este esquema é representativo de todas as amostras analisadas. Foram adquiridos 100.000 de eventos totais.

Após a separação destas subpopulações, foi possível analisar a pureza das mesmas, conforme figura 5.

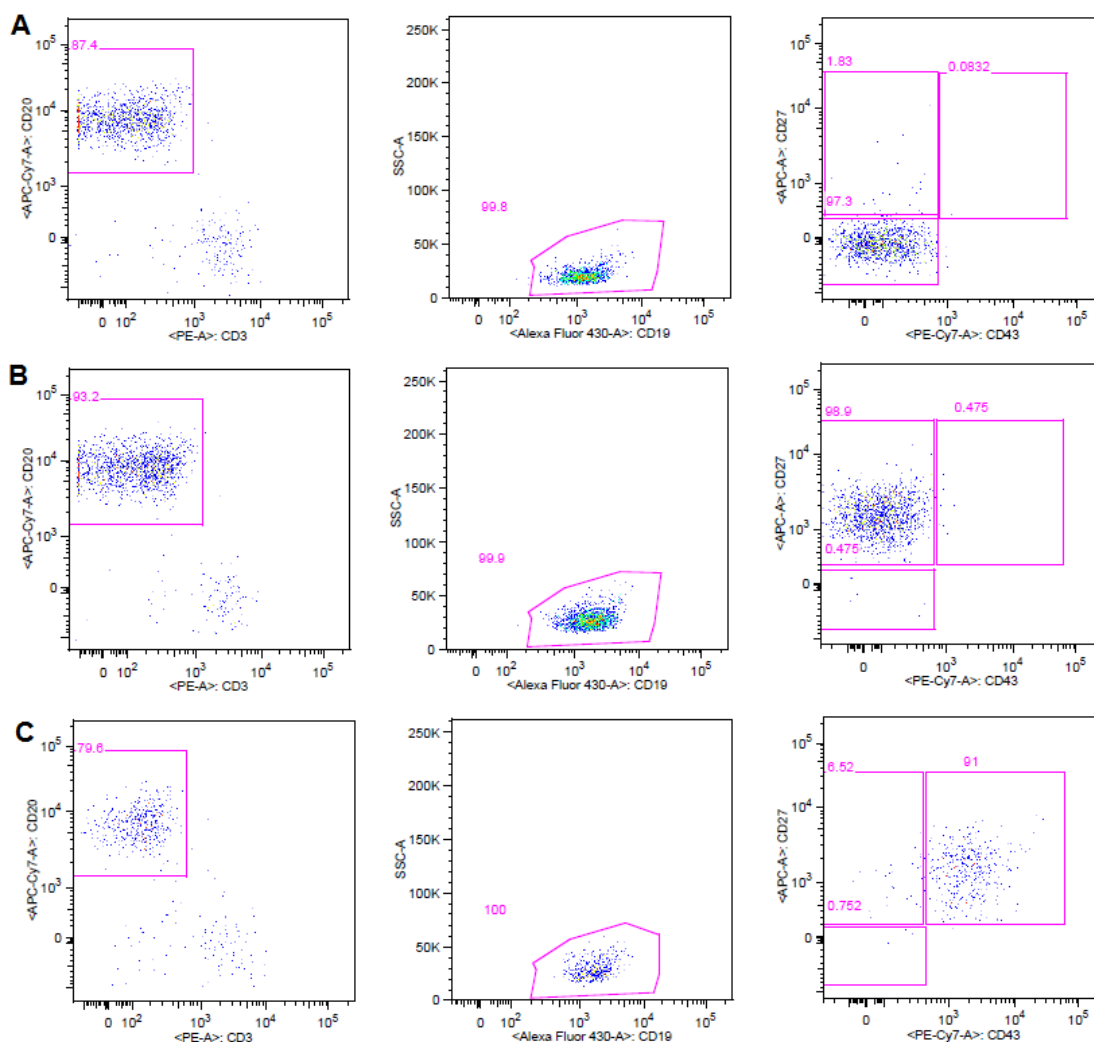


Figura 5. Análise de pureza de separação de subpopulações de linfócitos B de sangue periférico por citometria de fluxo. As subpopulações de células B foram isoladas e sua pureza avaliada. Em A, células naïve (CD20⁺ CD3⁻ CD19⁺ CD27⁻ CD43⁻); B, células de memória (CD20⁺ CD3⁻ CD19⁺ CD27⁺ CD43⁻); e C, células B-1 (CD20⁺ CD3⁻ CD19⁺ CD27⁺ CD43⁺). Este esquema é representativo de todas as amostras analisadas. Toda a amostra foi submetida à separação celular.

3.4 Ensaio de ELISPOT para detecção e avaliação da síntese de IgM por células B1

Placas de 96 poços MultiScreen-IP (MAIPS – Millipore) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal purificado específico para IgM humana, na diluição de 1:1000 em PBS 1X, em volume de 100 µL/poço. Após permanecerem *overnight* à temperatura ambiente, as placas foram lavadas três vezes com 200 µL/poço de PBS 1X, e os sítios inespecíficos foram bloqueados com 200 µL de R10, por 1 hora a 37°C.

Ao final dessa incubação, este volume foi desprezado, e as populações de linfócitos B isoladas, como já descrito anteriormente, foram plaqueadas, na condição de 4000 células/poço, em 100 µL de R10 e permaneceram *overnight* a 37°C e 5% CO₂.

Para a detecção de IgM produzida e secretada espontaneamente neste período de incubação, as células foram descartadas, e as placas foram lavadas seis vezes, como descrito anteriormente. Em seguida foi acrescentado, em cada poço, 100 µL de anticorpo monoclonal específico para IgM humana, conjugado à peroxidase (HRP, Southern Biotech), na diluição de 1:1000 em PBS 1X. As placas de ELISPOT (*Enzyme-linked Immunospot Assay*) foram incubadas por duas horas, à temperatura ambiente, e então lavadas seis vezes com PBS 1X.

Para a revelação, foram adicionados 100 µL da solução AEC (3-amino-9-ethylcarbazole - BD), e a reação foi interrompida, após uma hora, adicionando água deionizada. Após secagem completa das placas, a contagem de *spots* foi feita com o auxílio do leitor de placas de ELISPOT, e o número de spots obtido foi expresso como número de células produtoras de IgM, como demonstra a figura 6.

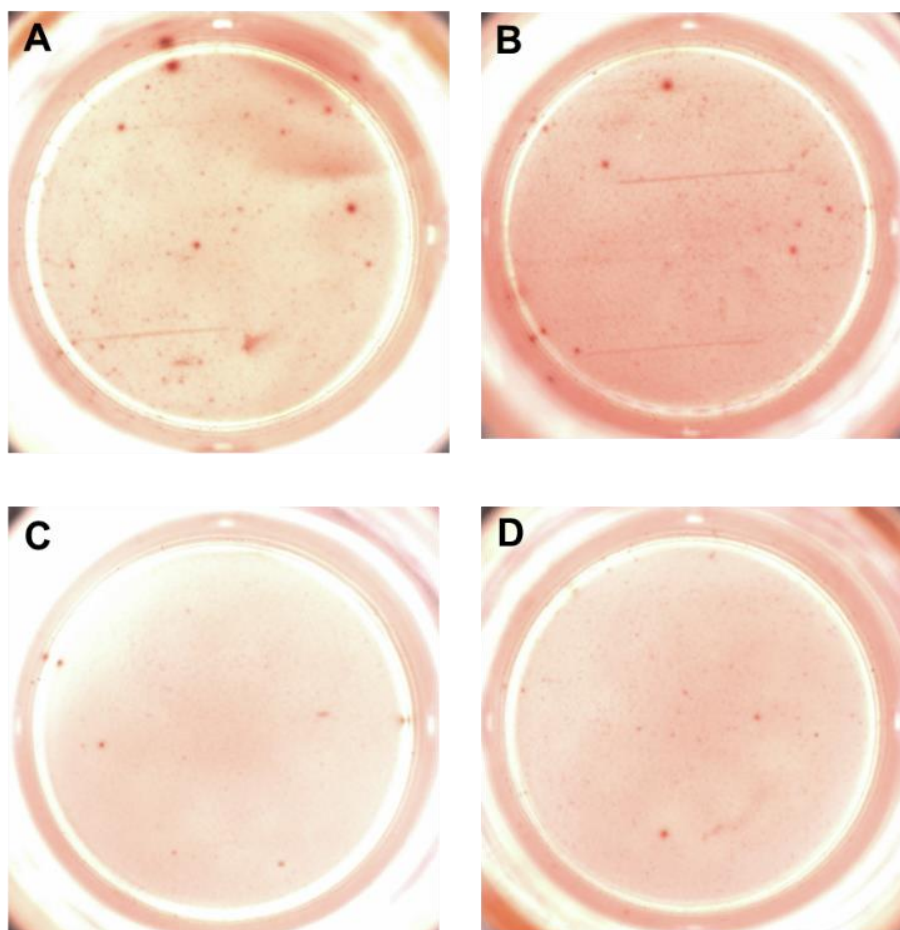


Figura 6. Detecção de células secretoras de IgM Nesta figura estão demonstradas replicatas das subpopulações de células B-1 plaqueadas na condição de 4000 células por poço. Os pontos visíveis, chamados de *spots*, representam células produtoras de IgM. As replicatas A e B exemplificam amostras com maior densidade de *spots*, ou seja, maior densidade de células produtoras de IgM, enquanto as replicatas C e D exemplificam amostras com menor densidade de *spots*. Os resultados de cada amostra representam a contagem de *spots* detectados por poço de células plaqueadas.

3.5 ELISA para detecção de IgM plasmática

Para a determinação de títulos de IgM no plasma dos pacientes randomizados, placas de 96 poços (High Binding, Costar) para ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal purificado específico para IgM humana (Southern Biotech), diluído em tampão carbonato 0,05 M (Na_2CO_3 0,015 M e NaHCO_3 0,035 M), na proporção de 1:8000, em um volume de 100 μL por poço. Após incubação *overnight* à temperatura ambiente, as placas foram lavadas três vezes com 200 μL /poço de PBS-Tween (PBST) 0,05%. Sítios inespecíficos foram bloqueados ao incubar as placas por 2 horas, à temperatura ambiente, com 150 μL /poço de solução de bloqueio (PBS-tween 0,05%, 1% de albumina sérica bovina e 5% de leite desnatado). Após três lavagens como descrito acima, as amostras foram aplicadas, partindo de uma mesma diluição, e, desta, seguiu-se uma diluição seriada na razão de dois. Após duas horas de incubação, as placas foram lavadas cinco vezes. A detecção foi realizada aplicando anticorpo monoclonal específico para IgM humana conjugado à peroxidase (HRP, Southern Biotech), diluído em solução de bloqueio, na proporção de 1:8000. Após duas horas de incubação, as placas foram lavadas cinco vezes, com PBS-T, como descrito anteriormente. A solução de revelação (tampão citrato, peróxido de hidrogênio e OPD) foi aplicada (100 μL /poço), e a reação, monitorada por até 15 minutos, foi interrompida com ácido sulfúrico 4N (50 μL /poço). As placas foram lidas em espectrofotômetro (EnSpire Multimode Plate Reader-PerkinElmer), no comprimento de onda de 492 nm.

O título de cada amostra foi definido como a primeira diluição da amostra que apresentasse absorbância maior que 0,1.

3.6 ELISA para determinação interleucinas plasmáticas

Para a determinação das interleucinas no plasma dos pacientes randomizados, realizamos método ELISA sanduiche in house, utilizando kit Human IL-4 ELISA Set, Human IL-6 ELISA Set e Human IL-10 ELISA Set (BD OptEIATM - BD Farinhem-USA), de acordo com instruções do fabricante, em plasma de 92 pacientes

Anticorpos monoclonais específicos para IL-4, IL-6, IL-10 foram diluídos em tampão carbonato- bicarbonato 1M, pH 9,4 utilizando a diluição 1/250. Volume de 100 µL por poço foi adicionado em placas de ELISA de 96 poços (COSTAR high binding-USA) e incubado por 18 horas a 4°C. Após três ciclos de lavagem com 250 µL PBST por poço, as placas foram bloqueadas por uma hora com 200 µL de solução PBS contendo 10% de soro fetal bovino à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram novamente lavadas por mais três vezes com PBST, para então receberem, sem diluição, 100 µL de plasma dos pacientes, em duplicata. Nesta etapa, também foram realizadas diluições seriadas de proteínas recombinantes de cada citocina, para obtenção de curva-padrão. Após duas horas de incubação as placas foram lavadas cinco vezes com PBST e incubadas por uma hora com 100 µL por poço de anticorpo biotinilados, específicos para cada citocina, juntamente com estreptovidina conjugada à enzima peroxidase (HRP), ambos componentes na diluição de 1/250.

A revelação foi realizada após ciclo de sete lavagens com PBST, adicionando-se em cada poço solução de TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidina) em tampão citrato 0,1 M (pH5,5), contendo peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida em até 30 minutos com 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2 N (Merck, Alemanha).

Foi realizada a leitura de absorbância a 450 nm em espectrofotômetro (EnSpire Multimode Plate Reader-PerkinElmer). O cálculo de concentração foi realizado utilizando a curva-padrão obtida para cada interleucina segundo orientações do fabricante.

3.7 Detecção de citocinas no sobrenadante de cultura de linfócitos T

A população de linfócitos T separadas por citometria celular foram cultivadas por três dias em placas de 96 poços de fundo em U, a 37°C e 5% de CO₂, em uma proporção de 50.000 células em 100 µL de meio R10. As culturas foram estimuladas com fitohemaglutinina na concentração de 5 µg/mL. Após este período, o sobrenadante foi coletado e mantido a -20°C.

As citocinas IFN γ , TNF α , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 foram dosadas nos sobrenadantes de cultura de célula T, utilizando o kit BD CBA Human Th1/Th2, de acordo com instruções do fabricante, e o citômetro de fluxo BD FACSCantoII™. As concentrações detectadas foram definidas por meio de curva padrão de cada citocina, analisadas utilizando o software de análise BD FCAPArray™

De 120 amostras iniciais, obtivemos valores acima do nível de detecção de mínima do kit em 58 pacientes.

3.8 Ressonância nuclear magnética e realce tardio

A ressonância magnética foi realizada com o objetivo de identificar e quantificar a área de necrose, isquemia e a zona de penumbra. Os exames foram realizados em equipamentos de alto campo (3,0 Teslas) com séries cineressonância (imageamento rápido em imagens de equilíbrio em precessão - FIESTA), adquiridas durante apneia de modo a garantir a reprodução de todo o ciclo cardíaco.

Tais sequências foram obtidas de forma a reproduzir as quatro cavidades cardíacas (cortes quatro câmaras) em projeções oblíquas transversais e as câmaras ventriculares (cortes eixo curto) em projeções oblíquas sagitais. Os parâmetros básicos incluíram mínimo tempo de eco, tempo de repetição ao redor de 45 – 60 ms, ângulo de inclinação (flipangle) entre 30 e 60° em tantos cortes quantos foram necessários para permitir a avaliação da espessura do miocárdio ao final de diástole e ao final de sístole, em todas as paredes ventriculares, de acordo com a divisão em 17 segmentos miocárdicos, conforme a classificação da American Heart Association.⁸⁵ A movimentação segmentar foi quantificada de acordo com a avaliação objetiva em: normal, hipocinético, acinético e discinético. Adicionalmente, as imagens em eixo curto serviram para o cálculo do volume diastólico final, volume sistólico final, fração de ejeção global e massa miocárdica.⁸⁶⁻⁹³ Em seguida, foram realizadas imagens de perfusão miocárdica. No caso da primeira avaliação o registro da opacificação do miocárdio foi feito sem nenhum tipo de estresse. Nos exames posteriores, foi acompanhada da injeção de 0,56 µg/kg de dipiridamol endovenoso, ou, se disponível, de 150 µg/kg/min de adenosina, seguida da administração de 1 mmol/kg de meio de contraste paramagnético (quelato de gadolínio), na velocidade de 3 ml/s. Tais imagens foram obtidas em múltiplas fases, de modo a permitir a quantificação da contrastação do miocárdio, que foi feita de modo visual e quantitativo, com o posicionamento de um cursor eletrônico, que mediu a intensidade de sinal ao longo da curva de tempo.

As imagens foram registradas no eixo curto do coração, com obtenção de, no mínimo, três planos simultâneos, diferentes e paralelos. A presença de defeito de perfusão foi definida como a área na qual não houve mudança significativa da intensidade de sinal após a injeção do meio de contraste paramagnético⁹⁴

A próxima série obtida, o mapeamento do tempo de relaxamento T1, utilizou imagens no meio do VE no eixo curto do coração obtida antes da injeção do meio de contraste paramagnético e repetida em intervalos de 5 min (somando seis pontos ao longo do tempo). Foram utilizadas sequências MOLLI (Modified Look Locker Inversion Recovery) ou sMOLLI.⁹⁵ Áreas com alta intensidade de sinal foram consideradas necrose/fibrose. Finalmente, entre 8 a 12 minutos após injeção do meio de contraste paramagnético, foram realizadas aquisições de realce tardio, com tempo de inversão segmentado e que tiveram o objetivo de demonstrar a fibrose ou necrose como zonas de elevada intensidade de sinal. Esta série objetivou quantificar a massa e percentual de necrose/fibrose miocárdica. Na avaliação inicial a presença de obstrução microvascular foi aferida utilizando-se imagens de perfusão (nas quais este achado se apresenta mais frequente) e imagens de perfusão utilizando a técnica do realce tardio precoce (entre 2 a 5 minutos após a injeção IV do contraste, utilizando sequência *singleshot* no eixo curto, que tem maior resolução espacial quando é feita a comparação com as imagens de perfusão) e tardio (após 10 minutos ou mais de injeção do contraste, utilizando sequências com segmentação de espaço K no eixo curto e nos eixos longos, com maior resolução espacial, nas quais a quantificação apresenta menor variabilidade de leitura.⁹⁶⁻⁹⁸ Além dos cálculos já expressos, a comparação das regiões de redução da contratilidade com as zonas de isquemia vistas à perfusão e áreas de realce tardio definiram a diferença entre área isquêmica e zona de necrose. Estes resultados foram expressos em gramas de miocárdio e porcentual de miocárdio para permitir comparação entre os grupos⁹⁴

3.9 Análise estatística

Análise estatística foi realizada no software SPSS Statistics 17.0. Variáveis com distribuição normal são apresentados como média e seu desvio padrão (\pm DP) e não-paramétrica com mediana e interquartis.

Utilizamos teste Qui-quadrado para variáveis categóricas e Wilcoxon *matched pairs test* para comparação dos pacientes nos diferentes tempos analisados. Para análise entre dois grupos, foi utilizado o teste *t-student* para variáveis numéricas com critérios de normalidade ou Mann-Whitney, caso o critério de normalidade não fosse preenchido.

Avaliamos associação entre os parâmetros imunes e clínicos com análise de correlação univariada de Pearson ou Spearman, este último caso a distribuição da variável contínua não preenchesse os critérios de normalidade. Para interpretação do tamanho do efeito ou a magnitude da associação foi considerado: $r = 0,10$ efeito pequeno; $r = 0,30$ efeito moderado e $r = 0,50$ efeito forte.^{99,100} Devido a natureza exploratória do estudo, análise multivariada para modelos de predição não foi realizada.

Foi considerada diferença estatística quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Características dos pacientes

Pacientes com IAMCST (n=120) tiveram média de idade de 55 anos, e em sua maioria eram do sexo masculino. Do total de pacientes, 60% eram hipertensos e 40% tabagistas.

De acordo com diretrizes de infarto e em razão à randomização aos grupos de tratamento, 100% dos pacientes participantes estavam em uso de estatina, associado a terapia de dupla antiagregação plaquetária.

Os indivíduos controles, tinham idade média de 56 anos, 30% do sexo masculino, mas também em sua maioria hipertensos. Neste grupo, 70% estavam em uso de estatinas e 10% eram tabagistas.

Podemos observar na Tabela 1, que apesar dos níveis basais de colesterol total (CT), LDLc e triglicérides dos pacientes com IAMCST não estivessem tão elevados (média 208 mg/dL e 138 mg/dL para CT e LDL, respectivamente e interquartis de 92-218 para triglicérides), foram significativamente mais altos do que os indivíduos controles. Já os níveis de HDLc, foram mais elevados nos controles. Os valores obtidos para a hemoglobina glicada não diferiram entre os grupos.

Tabela 1. Características basais dos grupos

	IAM (n=120)	Controles (n=20)	Valor p
Idade, anos \pm DP	55 \pm 8,3	56 \pm 13	0,793
Sexo masculino (%)	70	30	<0,001*
Colesterol total,mg/dL \pmDP	208 \pm 46	175 \pm 30	0,001*
HDL-c	43 \pm 13	53 \pm 10	0,001*
LDL-c	138 \pm 40	99 \pm 24	<0,001*
Triglicérides, mg/dL (IQ)	133 (92-218)	100 (71-126)	0,019*
HbA1c (%)	5,9 (5,5-6,6)	6,2 \pm 0,8	0,707
Creatinina, mg/dL (IQ)	0,84 (0,7-1,02)	0,79 (0,70-0,98)	0,667
PCRas	16,15 (7,09-36,84)	-	-
Tabagismo (%)	40,35	10	0,008*
Hipertensão (%)	59,65	55	0,716
Estatina (%)	100	70	0,013*

Os valores são expressos em médias e desvios-padrão (DP) ou mediana e interquartis (IQ); Utilizado Qui-quadrado para variáveis categóricas e teste t- Student ou Mann-Whitney para quantitativas; HbA1c= hemoglobina glicada; PCR as= proteína C reativa alta sensibilidade

4.2 Características da cinecoronariografia

Em relação a artéria culpada, após cineangiocoronariografia, 43% dos casos teve a obstrução identificada em descendente anterior, 40% coronária direita, 12,5% artéria circunflexa e em 4,2% não foram identificadas lesões obstrutivas coronarianas (Figura 7).

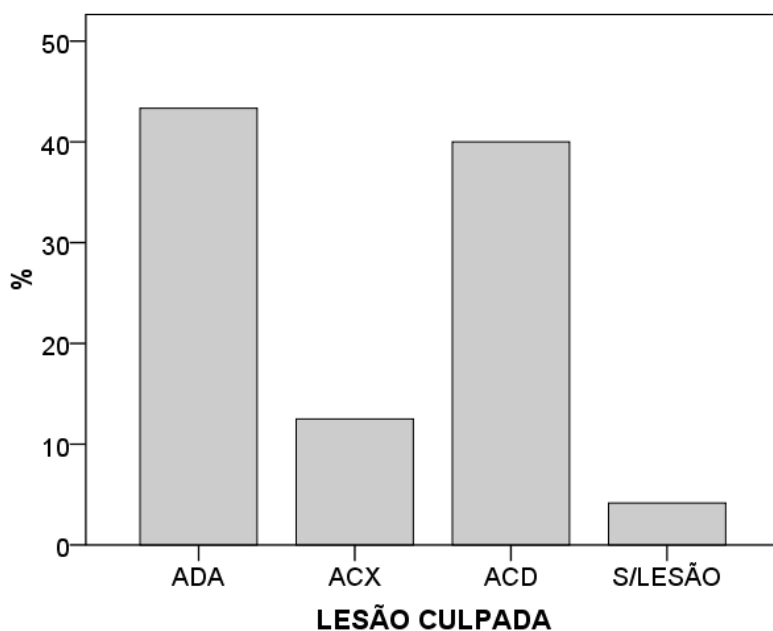


Figura 7. Artéria culpada pelo IAMCST identificada por cineangiocoronariografia. ADA – artéria descendente anterior; ACX – artéria circunflexa; ACD – artéria coronária direita.

4.3 Análise comparativa entre pacientes com infarto do miocárdio e amostra de indivíduos controles

Iniciamos o projeto com estudo piloto comparando indivíduos sem evidência de doença coronariana (controles) com os pacientes com infarto agudo miocárdio, pareados por idade.

Comparamos as variáveis de interesse entre os indivíduos controles e os pacientes com IAMCST no primeiro dia (D1) e no trigésimo dia do infarto (D30). As características dos grupos já foram descritas previamente.

Os pacientes com IAMCST possuem número maior de leucócitos que os controles em ambos os tempos analisados ($p < 0,001$ em D1 e $p = 0,006$ em D30), como demonstrado na tabela 2. Em relação ao número total de linfócitos, não detectamos diferença significativa entre os indivíduos controles e pacientes infartados em D1 ($p = 0,79$) ou em D30 ($p = 0,15$). (Tabela 2)

De forma interessante, apesar do número total de linfócitos não diferir entre controles e pacientes com IAMCST, a distribuição das subpopulações de linfócitos foi diferente, especialmente para os linfócitos B. (Tabela 2)

Os linfócitos B1 estão em maior número nos pacientes com IAMCST em ambos os tempos ($p < 0,001$ em D1 e $p = 0,001$ em D30), assim como nos subtipos B1CD11b⁺ e B1CD11b⁻ (tabela 2). Já para os linfócitos B2, não detectamos diferença significativa entre controles e pacientes infartados em ambos os tempos analisados ($p = 0,88$ em D1 e $p = 0,772$ em D30). (Tabela 2)

Avaliamos também a expressão do receptor TLR4 na superfície dos linfócitos B2 e B1. Estas células estavam em maior número nos pacientes infartados em ambos os tempos, para ambas as subpopulações ($p < 0,001$ em D1 e $p = 0,025$ em D30 para subpopulação de linfócitos B2TLR4⁺. Para os linfócitos B1TLR4⁺ $p < 0,001$ em D1 e em D30).

Apenas os linfócitos TCD4⁺, se analisados em sua porcentagem do total de linfócitos, é significativamente menor nos indivíduos controles do que nos pacientes IAMCST, e somente em D30 ($p = 0,023$ em D30 e $p = 0,146$ em D1), como mostra a figura 8. Não detectamos diferença significativa entre controles e infartados em

número absoluto (células/ml) em nenhuma das subpopulações de linfócitos T. (Tabela 2)

A imunoglobulina M (IgM) dosada no plasma apresentou títulos mais elevados nos pacientes infartados, independentemente do tempo analisado ($p=0,006$ em D1 e $p<0,001$ em D30). Não detectamos diferença significativa na produção espontânea de IgM pelos linfócitos B1 verificada por ELISPOT entre controles e infartados ($p=0,19$ em D1 e $p=0,15$ em D30).

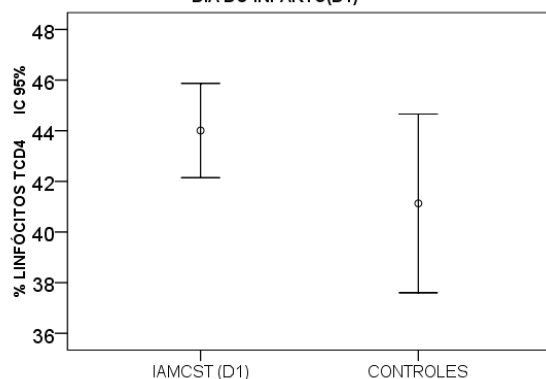
Tabela2. Comparação entre a distribuição das subpopulações de linfócitos no primeiro dia (D1) do IAMCST e após 30 dias (D30) com controles

	IAMCST(D1)	Controles	IAMCST (D30)	p	p#
	Nº Abs (cels/ml)	Nº Abs (cels/ml)	Nº Abs (cels/ml)		
Leucócitos	10855(9160-13375)	6175(5500-7430)	7620(6568-8928)	<0,001	0,006
Linfócitos	2195(1522-2994)	2131(1822-2706)	1973(1542-2431)	0,798	0,145
TCD4 ⁺	921(627-1274)	920(652-1209)	886(697-1155)	0,962	0,814
TCD8 ⁺	339(212-501)	407(266-592)	324(195-504)	0,193	0,108
B2 total	144(87-229)	96(80-162)	108(68-175)	0,088	0,772
B2TLR4 ⁺	2,02(1,01-4,24)	0,83(0,64-1,13)	1,40(0,61-2,90)	<0,001	0,025
B1 total	5,25(3,03-10,71)	2,08(1,07-3,08)	3,82 (2,21-7,12)	<0,001	0,001
B1TLR4 ⁺	0,37(0,21-0,73)	0,07(0,03-0,12)	0,21(0,11-0,41)	<0,001	<0,001
B1CD11b ⁺	1,75 (1,02-3,45)	0,82(0,48-1,02)	1,41(0,68-2,29)	<0,001	0,002
B1CD11b ⁻	3,33(1,61-6,67)	1,18(0,57-2,14)	2,19(1,20-4,77)	<0,001	0,002

Os valores são expressos em mediana e interquartis (IQ); Utilizado teste Mann-Whitney; p= valor de p análise D1 com controles; p# = valor de p análise D30 com controles.

A)

COMPARAÇÃO ENTRE A PORCENTAGEM (%) DE LINFÓCITOS TCD4+ EM INDIVÍDUOS CONTROLES E PACIENTES IAMCST NO PRIMEIRO DIA DO INFARTO (D1)



B)

COMPARAÇÃO ENTRE A PORCENTAGEM (%) DE LINFÓCITOS TCD4+ EM INDIVÍDUOS CONTROLES E PACIENTES IAMCST APÓS 30 DIAS DO INFARTO (D30)

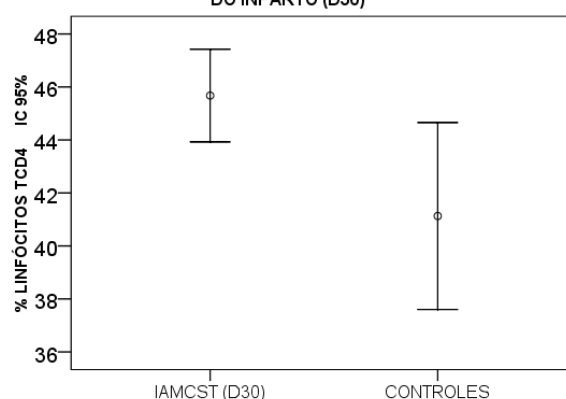


Figura 8. Comparação entre a porcentagem de linfócitos TCD4+ entre controles e pacientes com IAMCST. Em A) comparação entre controles e infartados em D1 ($p=0,146$) e em B) comparação entre controles e pacientes IAMCST em D30 ($p=0,023$). A porcentagem de linfócitos TCD4+ é significativamente menor nos indivíduos controles do que nos pacientes IAMCST apenas em D30. Teste t-Student para amostras independentes.

4.4 Comparação entre leucócitos totais e número absoluto de linfócitos nos pacientes com IAMCST no primeiro dia (D1) e após um mês (D30) do evento

O número de leucócitos diminuiu após 30 dias ($p<0,001$), assim como número absoluto de linfócitos ($p=0,001$) (Tabela 3).

Todos os subtipos de linfócitos B2 e B1, em células/mL, foram maiores em D1. Já os linfócitos TCD4+ diminuíram após 30 dias do evento, enquanto os linfócitos TCD8+ não se modificaram quantitativamente (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição das subpopulações de linfócitos dos pacientes com infarto do miocárdio no primeiro dia (D1) e após 30 dias (D30)

	D1	D30	Valor de p
	Nº Abs (cels/ml)	Nº Abs (cels/ml)	
Leucócitos	10855 (9160-13375)	7620 (6568-8928)	<0,001
Linfócitos	2195 (1522-2994)	1973 (1542-2431)	0,001
TCD4 ⁺ (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	921(627-1274)	886 (697-1155)	0,049
TCD8 ⁺ (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	339 (212-501)	324 (195-504)	0,097
B2 total (CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD43 ⁻)	144 (87-229)	108 (68-175)	<0,001
B1 total (CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD27 ⁺ CD43 ⁺)	5,25 (3,03-10,71)	3,82 (2,21-7,12)	<0,001
B1 CD11b ⁺	1,75 (1,02-3,45)	1,41(0,68-2,29)	<0,001
B1 CD11b ⁻	3,33(1,61-6,67)	2,19(1,20-4,77)	<0,001

Dados expressos como mediana e interquartis. Comparações feitas pelo teste de Wilcoxon.

A frequência dos linfócitos no sangue periférico dos pacientes com IAMCST foi de 44% para células TCD4 e 17% para linfócitos TCD8. Os linfócitos B2 clássicos corresponderam a 7%, enquanto células B1 a menos que 1% do total de linfócitos. Os demais 31% de células não foram fenotipados neste estudo. (Figura 9)

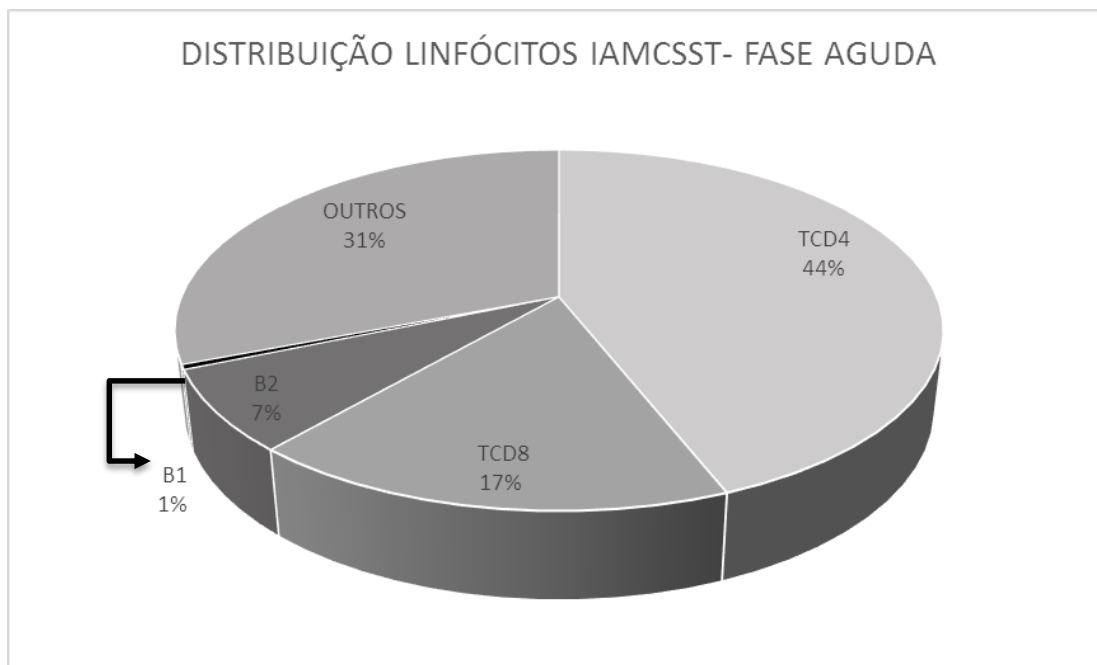


Figura 9. Frequência (%) dos linfócitos TCD4, TCD8, B2 e B1 no primeiro dia do IAMCSST. Valores expressos em mediana, exceto para células TCD4 (média).

Apenas as subpopulações de linfócitos B2 e B1, foram analisados quanto à presença do receptor TLR4. Os pacientes apresentaram maior número de linfócitos B com expressão deste receptor no primeiro dia do IAMCSST para ambas as subpopulações. Figura 10 e figura 11, respectivamente.

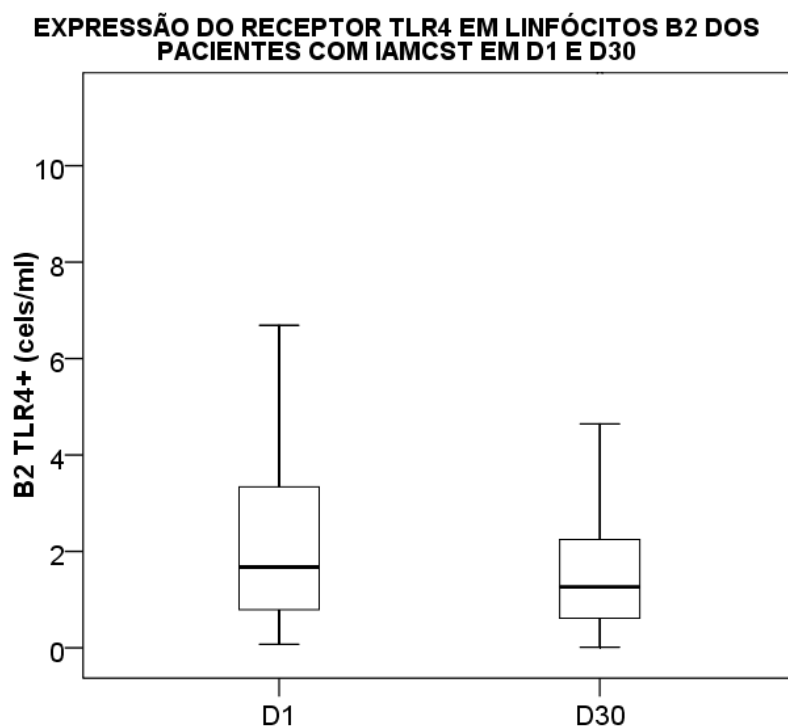


Figura 10. Expressão do receptor TLR4 em linfócitos B2 dos pacientes IAMCST no primeiro dia e após 30 dias. Maior número de células B2TLR4+ foi observado no primeiro dia do IAMCST (D1>D30, $p = 0,002$, teste Wilcoxon)

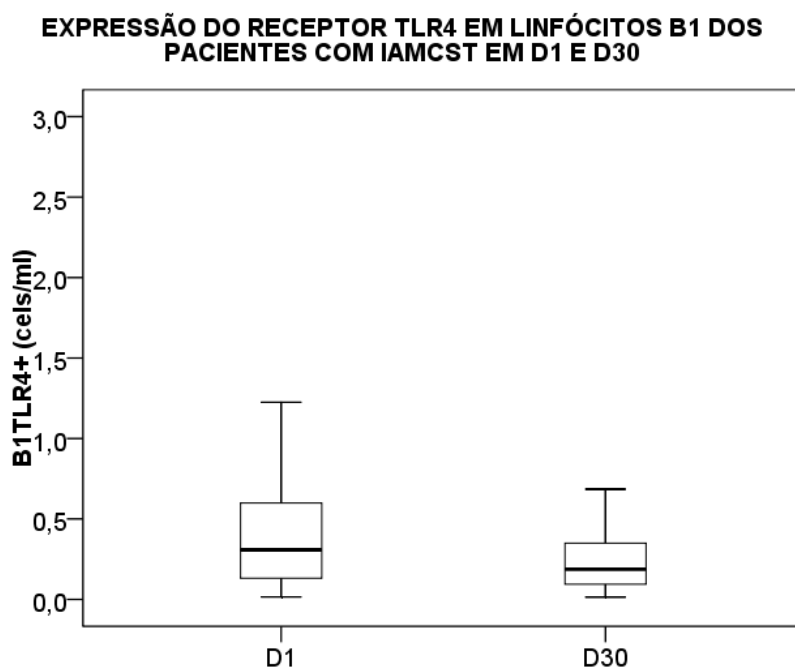


Figura 11. Expressão do receptor TLR4 em linfócitos B1 dos pacientes IAMCST no primeiro dia e após 30 dias. Maior número de células B1TLR4+ foi observado no primeiro dia do IAMCST (D1>D30, $p < 0,001$, teste de Wilcoxon)

4.5 Imunoglobulina M (IgM) plasmática e IgM produzida de forma espontânea pelos linfócitos B1 no primeiro dia e após um mês do IAMCST

A concentração de imunoglobulina M (IgM) quantificada no plasma foi maior no trigésimo dia do infarto miocárdio. Figura 12.

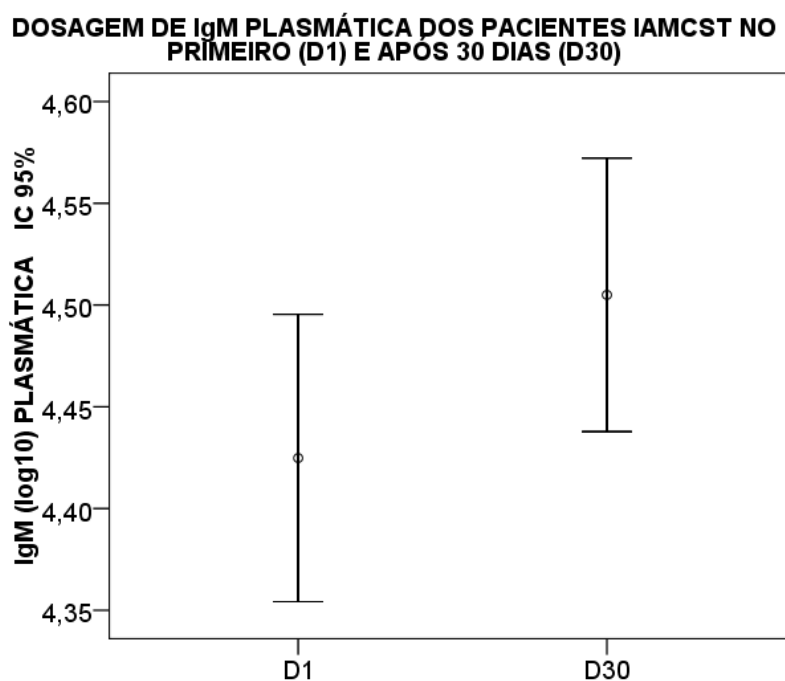


Figura 12. Dosagem de IgM plasmática dos pacientes IAMCST em D1 e D30. A concentração de IgM plasmática quantificada por ELISA foi maior após 30 dias do IAMCST (D30 > D1, $p < 0,001$, teste t-Student para amostras dependentes).

A técnica de ELISPOT foi utilizada para que avaliássemos se as células B1 secretavam IgM de forma espontânea. Não houve diferença estatística entre o número de células B1 produtoras de IgM nos tempos analisados. (Figura 13)

DOSAGEM DE IgM SECRETADA DE FORMA ESPONTÂNEA POR LINFÓCITOS B1 POR ELISPOT EM PACIENTES COM IAMCST EM D1 E D30

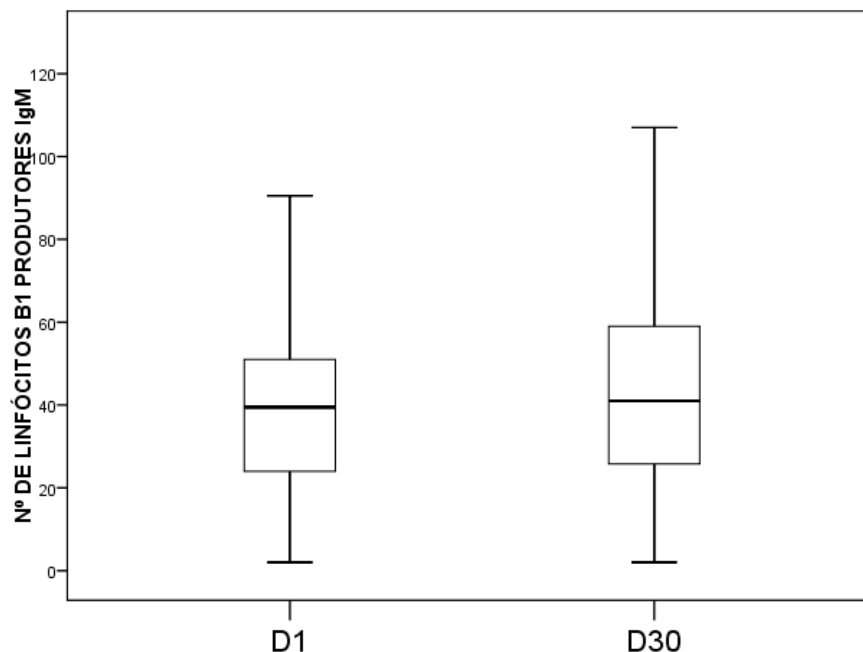


Figura 13. Dosagem de IgM secretada de forma espontânea por linfócitos B1 em pacientes com IAMCST. Técnica ELISPOT. Não houve diferença entre os dois tempos analisados ($p = 0,32$; teste de Wilcoxon).

4.6 Correlações entre subpopulações de linfócitos B e aumento da IgM plasmática

Para verificarmos qual das subpopulações de linfócitos B seria responsável pelo aumento de IgM circulante, realizamos análise de correlação entre estas duas variáveis.

Houve tendência para correlação positiva entre as células B1 produtoras de IgM de forma espontânea (ELISPOT) no primeiro dia do infarto com os títulos plasmáticos de IgM; e associação positiva significativa aos 30 dias (Tabela 4).

Tabela 4. Relação entre a imunoglobulina M (IgM) plasmática e o número de linfócitos B1 secretores de IgM espontânea (ELISPOT) no primeiro dia (D1) e após 30 dias (D30) do IAMCST

	IgM D1		IgM D30	
	<i>Rho</i>	<i>p</i>	<i>Rho</i>	<i>p</i>
B1 IgM	0,187	0,052	0,227	0,014*

B1IgM= linfócito B1 produtor imunoglobulina M (IgM). * $p < 0,05$ (teste de Spearman)

A técnica ELISPOT foi realizada com o total de linfócitos B1. A característica desta subpopulação é produzir IgM. Detectamos correlação positiva no primeiro dia e após 30 dias em ambos os subtipos células B1 (Tabela 5).

Tabela 5. Relação entre linfócitos B1 com secreção espontânea de IgM (ELISPOT) e subtipos de linfócitos B1 (cels/mL) quantificados no primeiro dia (D1) e após 30 dias (D30) do IAMCST

	ELISPOT D1		ELISPOT D30	
	<i>Rho</i>	<i>p</i>	<i>Rho</i>	<i>p</i>
B1CD11b ⁺ (CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD27 ⁺ CD43 ⁺ CD11b ⁺)	0,252	0,008	0,214	0,021
B1CD11b ⁻ (CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD27 ⁺ CD43 ⁺ CD11b ⁻)	0,227	0,017	0,332	<0,001

Rho: Correlação de Spearman; IAMCST – infarto agudo do miocárdio com supradesnível de segmento ST.

4.7 Níveis plasmáticos de interleucinas e citocinas dosadas no sobrenadante de cultura de linfócitos T dos pacientes IAMCST em D1 e D30

As interleucinas 4 (IL-4) e 10 (IL-10) quantificadas no plasma dos pacientes IAMCST aumentaram após 30 dias do infarto, enquanto a IL-6 manteve-se estável. Figura 13, 14 e 15, respectivamente.

O perfil de secreção das citocinas no sobrenadante de cultura dos linfócitos T, após estímulo mitogênico, no primeiro dia e após 30 dias do IAMCST está demonstrado na Figura 17. Este manteve-se muito semelhante nos dois tempos.

Apenas a IL-6 produzida pelos linfócitos T aumentou após 30 dias do evento. Não houve diferença de secreção de $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, IL-10, IL-4 ou IL-2. (Tabela 6 e figura 17)

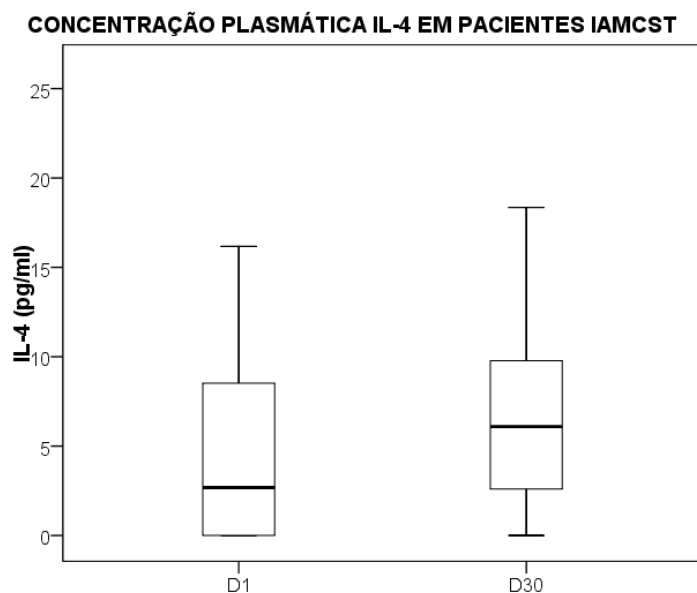


Figura 14. Concentração interleucina 4 (IL-4) em pacientes IAMCST no primeiro dia e após 30 dias. Houve aumento nos níveis de IL-4 (D30 > D1, $p=0,013$, teste Wilcoxon).

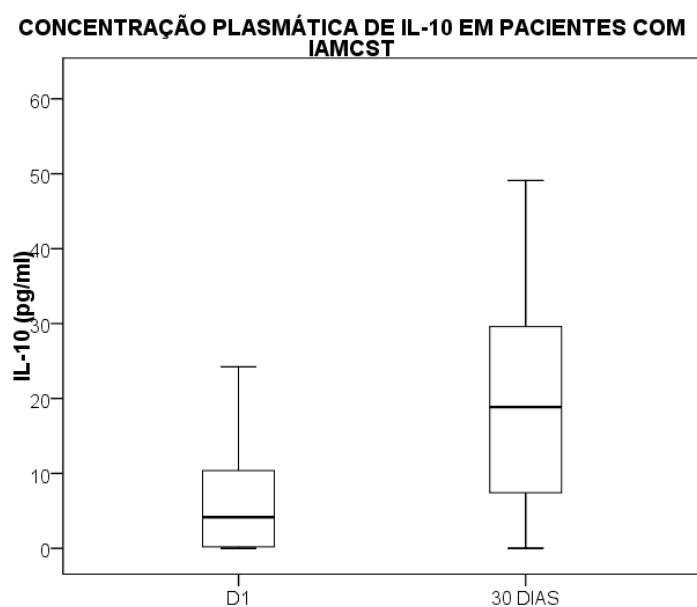


Figura 15. Concentração interleucina 10 (IL-10) em pacientes IAMCST no primeiro dia e após 30 dias. Houve aumento na concentração de IL-10 (D30 > D1, $p<0,001$, teste Wilcoxon).

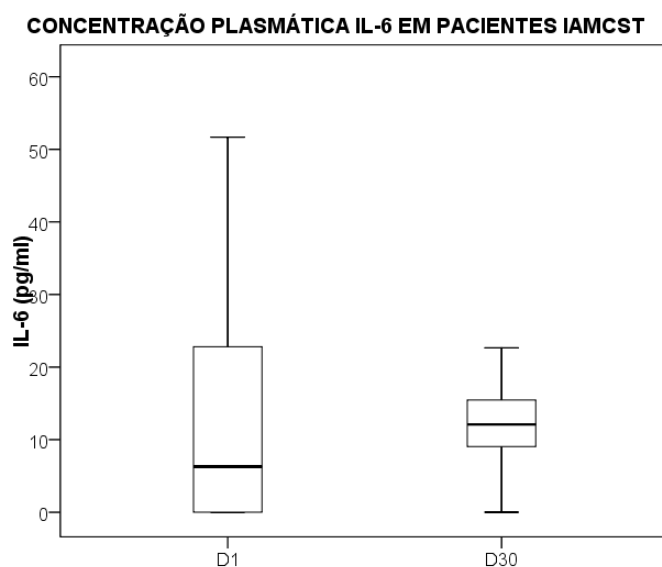


Figura 16. Concentração interleucina 6 (IL-6) em pacientes IAMCST no primeiro dia e após 30 dias. Não há diferença entre os dois tempos ($p=0,31$, teste de Wilcoxon)

Tabela 6. Avaliação da secreção de citocinas no sobrenadante de cultura de linfócitos T no primeiro dia (D1) e após 30 dias (D30) do IAMCST

	TNF- α	IFN- γ	IL-6	IL-4	IL-10	IL-2
Z	-0,467	-0,307	-2,202	-1,316	-1,246	-1,639
valor de p	0,641	0,758	0,028*	0,188	0,213	0,101

Houve aumento nos níveis de IL-6 ($D30 > D1$, teste de Wilcoxon), mas não para as demais interleucinas analisadas.

CITOCINAS DOSADAS NO SOBRENADANTE DE CULTURA DE LINFÓCITOS T DOS PACIENTES NO PRIMEIRO DIA (D1) E APÓS 30 DIAS (D30) DO IAMCST

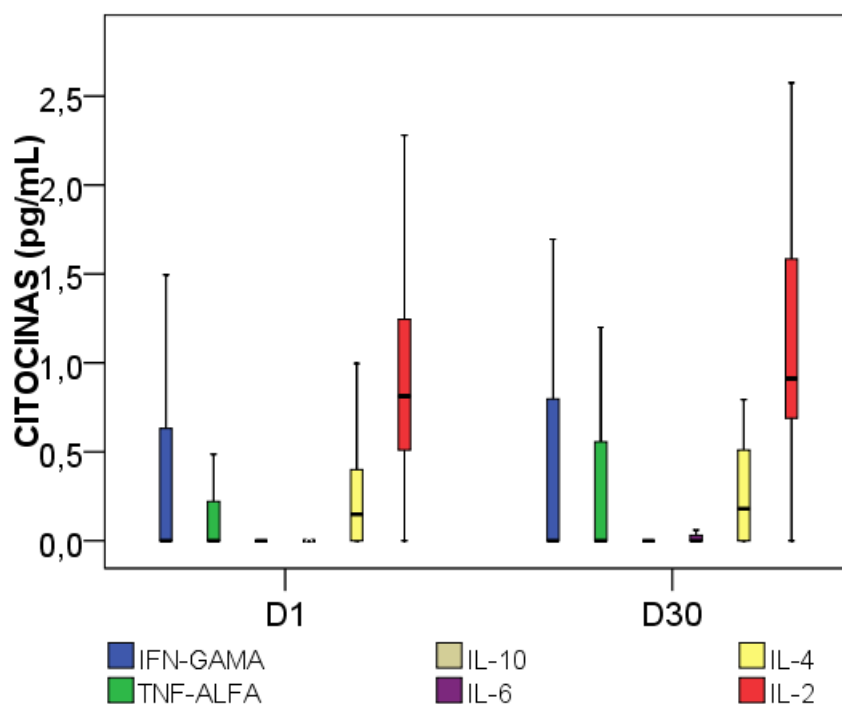


Figura 17. Citocinas detectadas no sobrenadante de cultura de linfócitos T dos pacientes IAMCST. Houve aumento dos níveis de IL-6 (D30 > D1, teste de Wilcoxon), mas não para as demais interleucinas analisadas

4.8 Correlações entre as subpopulações de linfócitos e interleucinas plasmáticas

Afim de verificarmos se os subtipos de linfócitos quantificados apresentavam as mesmas funções descritas em modelos experimentais, realizamos correlações entre as subpopulações de linfócitos e as interleucinas plasmáticas.

No primeiro dia do infarto, o linfócito B1, em porcentagem de células, apresentou associação positiva com IL-10, com envolvimento de ambos os subtipos de B1: B1CD11b⁻ e B1CD11b⁺. Não detectamos relação entre IL-10, IL-6 ou IL-4 e os linfócitos B clássicos (Tabela 7).

No trigésimo dia do infarto, existiu associação negativa do linfócito B2 com IL-10. Já para os linfócitos B1, houve correlação positiva com IL-4 e negativa com IL-6, envolvendo apenas o subtipo B1CD11b⁻ (Tabela 7).

Tabela 7. Correlações entre linfócitos B e interleucinas plasmáticas no primeiro dia (D1) e após 30 dias (D30) do IAMCST

		D1			D30		
		IL4	IL6	IL10	IL4	IL6	IL10
B2, % (CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD43 ⁻)	Rho	0,05	0,14	-0,10	0,18	-0,02	-,263*
	p	0,64	0,18	0,37	0,10	0,86	0,01
B2, céls/mL	Rho	-0,01	0,08	-0,10	0,18	0,00	-0,18
	p	0,95	0,47	0,34	0,09	0,97	0,09
B1, % (CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD27 ⁺ CD43 ⁺)	Rho	0,05	0,08	0,267*	0,236*	-0,20	-0,02
	p	0,62	0,45	0,01	0,02	0,06	0,82
B1, céls/mL	Rho	0,01	-0,01	0,16	0,232*	-0,22	-0,03
	p	0,89	0,91	0,12	0,03	0,04	0,80

*Correlações significantes obtidas entre células B1 ou B2 e interleucinas (correlação de Spearman).

Em relação às células T, apenas em porcentagem de linfócitos TCD4⁺, após 30 dias do infarto, houve correlação negativa com IL-4. Demais interleucinas não tiveram associação demonstrável com linfócitos TCD8⁺ ou TCD4⁺. (Tabela 8)

Tabela 8. Correlações entre linfócitos T e interleucinas plasmáticas no primeiro dia (D1) e após 30 dias (D30) após o IAMCST

		D1			D30		
		IL4	IL6	IL10	IL4	IL6	IL10
TCD4, %	Rho	0,05	-0,11	0,06	-0,262*	0,05	0,18
	p	0,67	0,28	0,58	0,012	0,62	0,09
TCD4, céls/mL	Rho	-0,06	-0,15	-0,06	-0,02	0,03	0,09
	p	0,58	0,16	0,55	0,83	0,79	0,41
TCD8, %	Rho	-0,09	-0,06	-0,18	0,14	0,01	0,00
	p	0,43	0,56	0,10	0,18	0,95	1,00
TCD8, céls/mL	Rho	-0,13	-0,12	-0,18	0,17	-0,03	0,00
	p	0,23	0,25	0,09	0,11	0,81	0,99

*Correlação negativa significativa entre linfócito TCD4 e IL4 (correlação de Spearman).

4.9 Correlação entre o subtipo B1CD11b⁺ e os linfócitos TCD4⁺

Afim de verificarmos se o subtipo de linfócitos B1CD11b⁺ está relacionado a expansão clonal de linfócitos TCD4⁺ como descrito experimentalmente, realizamos correlação entre estas subpopulações.

Os linfócitos B1CD11b⁺ apresentaram correlação positiva com as células TCD4⁺, em ambos os tempos analisados. (Tabela 9)

Tabela 9. Relação entre linfócitos B1CD11b⁺ (cels/mL) e linfócitos TCD4⁺ (cels/mL) quantificados no primeiro dia (D1) e após 30 dias (D30) após IAMCST

	TCD4 D1		TCD4 D30	
	Rho	p	Rho	p
B1CD11b ⁺	0,343	<0,001	0,291	0,001

Correlação significante entre linfócitos B1 CD11b⁺ e linfócitos T CD4 (correlação de Spearman).

4.10 Correlações entre massa de infarto do ventrículo esquerdo e as subpopulações de linfócitos

O subtipo B1CD11b⁺, no primeiro dia do infarto, foi o único a apresentar associação com a massa de infarto (g) quantificada pela RNM cardíaca. A associação foi positiva com massa de infarto, porém fraca (Tabela 10 e Figura 18)

Não encontramos correlação entre qualquer outra subpopulação de linfócitos com a massa de infarto (g) quantificada pela RNM cardíaca, em D1 ou em D30. (Tabela 10)

Tabela 10. Relação entre subpopulações de linfócitos no primeiro dia (D1) e após 30 dias (D30) do IAMCST com a massa de infarto (g) pela RNM em D30

	FIBROSE Vs D1		FIBROSE Vs D30	
	<i>Rho</i>	p	<i>Rho</i>	p
B1 IgM	-0,02	0,834	0,106	0,255
B2	0,091	0,326	-0,056	0,546
B1CD11b+	0,184*	0,045*	0,049	0,597
B1CD11b-	0,036	0,699	0,072	0,435
TCD4	-0,034	0,715	-0,016	0,865
TCD8	0,019	0,839	-,062	0,504

Rho: Correlação de Spearman. B1IgM= linfócito B1 produtor imunoglobulina M(IgM) B2=linfócito B clássico. B1CD11b+=linfócito B1 expressa a molécula CD11b (em %). TCD4= linfócito T helper. TCD8=linfócito T citotóxico

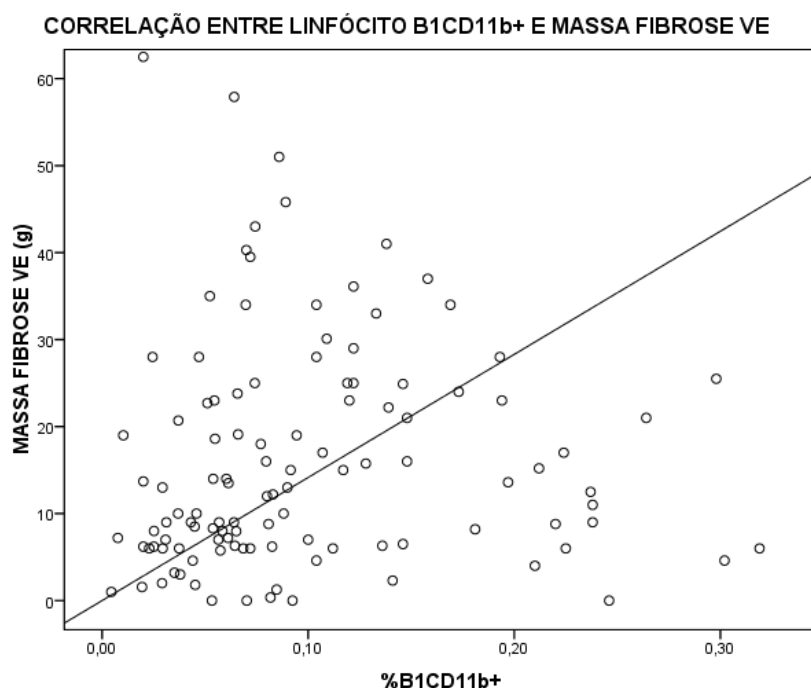


Figura 18. Correlação do linfócito B1CD11b+ com massa infarto (g) do ventrículo esquerdo (VE). Associação positiva, fraca. $p=0,045$ $Rho=0,184$

4.11 Correlação entre massa de infarto do ventrículo esquerdo e IgM plasmática

A IgM total, quantificada no sangue periférico dos pacientes com IAMCST, em ambos os tempos analisados, não apresentou correlação com massa de infarto em gramas ou em sua porcentagem da massa de VE. (Tabela 11)

Tabela 11. Relação entre imunoglobulina M (IgM) plasmática quantificada no primeiro dia (D1) e após 30 dias (D30) do IAMCST com fibrose miocárdica pela RNM (D30)

	IgM D1		IgM D30	
	<i>Rho</i>	p	<i>Rho</i>	p
Fibrose(g)	0,051	0,584	0,065	0,484
% fibrose VE	0,007	0,937	0,004	0,969

Rho: Correlação de Spearman. VE= ventrículo esquerdo. RNM= ressonância nuclear magnética.

4.12 Correlações entre parâmetros RNM cardíaca, proteína C-reativa de alta sensibilidade (PCRas) e interleucinas plasmáticas

Em relação às interleucinas, apenas IL-6 plasmática, no primeiro dia do IAMCST, apresentou associação com parâmetros da RNM cardíaca: a IL-6 apresentou correlação negativa moderada com a FEVE e positiva moderada com massa infartada (Tabela 12).

De forma interessante, apenas IL-6 foi associada positivamente ao nível de proteína C-reativa de alta sensibilidade (PCRas) basal dos pacientes com IAMCST (Tabela 13).

Tabela 12. Correlações entre fração ejeção do VE e a massa infartada no primeiro dia (D1) e após 30 dias (D30) com as interleucinas plasmáticas e proteína C-reativa de alta sensibilidade (PCRas)

		FE%	Massa de fibrose (g)	% fibrose do VE
IL4 D1	Rho	-0,02	0,08	0,05
	p	0,88	0,46	0,68
IL4 D30	Rho	-0,04	0,08	0,09
	p	0,68	0,47	0,37
IL6 D1	Rho	-0,380**	0,414**	0,354**
	p	<0,001	<0,001	<0,001
IL6 D30	Rho	-0,01	0,20	0,13
	p	0,90	0,06	0,21
IL10 D1	Rho	-0,01	0,16	0,11
	p	0,90	0,14	0,30
IL10 D30	Rho	0,03	-0,06	-0,06
	p	0,77	0,58	0,60
PCRas D1	Rho	-0,07	0,14	0,14
	p	0,55	0,20	0,21

*Houve correlação entre IL-6 no D1 com massa infartada e função ventricular esquerda obtida pela RNM cardíaca (correlação de Spearman). VE= ventrículo esquerdo. PCRas= proteína C reativa de alta sensibilidade.

Tabela 13. Correlação entre a PCRas em D1 e interleucinas plasmáticas dos pacientes com IAMCST no primeiro (D1) e após 30 dias (D30)

	D1			D30		
	IL4	IL6	IL10	IL4	IL6	IL10
Rho	-0,11	0,321**	0,03	0,09	0,05	0,08
p	0,34	<0,001	0,78	0,42	0,67	0,45
PCR basal						

IAMCST=infarto do miocárdio com supradesnívelamento do segmento ST. Houve correlação positiva entre IL-6 e PCRas em D1 (correlação de Spearman). PCRas= proteína C reativa de alta sensibilidade.

4.13 Influência do braço de tratamento nas subpopulações de linfócitos

O tipo de tratamento instituído, após 30 dias de uso, não influenciou as subpopulações de linfócitos. (Tabela 14)

Tabela 14. Influência do braço de tratamento nas subpopulações de linfócitos (cels/mL) após 30 dias de tratamento com sinvastatina+ezetimiba/clopidogrel, sinvastatina+ezetimiba/ticagrelor, rosuvastatina/clopidogrel ou rosuvastatina/ticagrelor

	TCD4 ⁺	TCD8 ⁺	B2	B1
Chi-Square	6,226	5,371	3,707	3,908
df	3	3	3	3
p	0,10	0,15	0,29	0,27

Não houve diferenças pelos tratamentos entre as populações de linfócitos (teste Kruskal-Wallis)

Refinando a análise, mesmo explorando a influência do tratamento sobre as subpopulações de linfócitos B com expressão do receptor TLR4 em sua superfície, não verificamos diferença entre os grupos. (Tabela 15)

Tabela 15. Influência do braço de tratamento nas subpopulações de linfócitos B TLR4⁺ (cels/ml) após 30 dias de tratamento com sinvastatina+ezetimiba/clopidogrel, sinvastatina+ezetimiba/ticagrelor, rosuvastatina/clopidogrel ou rosuvastatina/ticagrelor

	B1 TLR4 ⁺	B2 TLR4 ⁺
Chi-Square	2,288	0,795
df	3	3
p	0,515	0,851

Não houve diferenças nesta análise de linfócitos pelo tratamento instituído (teste Kruskal - Wallis).

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, investigamos parâmetros imunes de pacientes com IAMCST, tratados de forma homogênea com estratégia fármaco-invasiva nas primeiras seis horas de diagnóstico. Estes foram randomizados aleatoriamente para 4 braços com diferentes combinações de dois antiplaquetários e dois hipolipemiantes. Pacientes com infarto prévio, mesmo no topo do tratamento preconizado com antiplaquetários e estatinas, são indivíduos de alto risco cardiovascular¹⁰¹ e como demonstrado por Joshi e colaboradores¹⁰² a recorrência precoce de IAM foi quatro vezes maior neste grupo. Além disto, estes pacientes têm 20% de aumento na atividade metabólica em placas ateroscleróticas situadas na aorta se comparados a pacientes com infarto sem supradesnívelamento do segmento ST (IAMSST) ou com angina estável, expondo um risco residual inflamatório que ainda pode ser melhor abordado.

A comprovação da eficácia da abordagem da inflamação em pacientes com infarto do miocárdio foi demonstrada com a inibição da interleucina-1 β , pelo estudo CANTOS.¹⁶ Entretanto, este é um componente complexo, pois envolve diferentes interações celulares e de citocinas que, dependendo da subpopulação, pode exercer papel pró ou anti-inflamatório. Neste cenário, a literatura sobre o papel dos linfócitos B na síndrome coronariana ainda é restrita¹⁰³ e sua contribuição após a exposição de antígenos na injúria miocárdica não pode ser negligenciada. Estudos em modelos animais sugerem que estas células poderiam influenciar a cicatrização do infarto,¹⁰³ e seu papel ambíguo na aterogênese está bem documentado.¹⁰⁴

O refinamento do conhecimento sobre os linfócitos B na aterosclerose, principalmente em estudos clínicos, tem sido sugerido em vários artigos de revisão sobre o assunto.¹⁰⁵ Estes linfócitos, pela produção de citocinas, anticorpos e íntima interação com os linfócitos T, poderiam representar alvos interessantes de novas terapias, uma vez que a reperfusão da artéria culpada, propicia novo infiltrado na área infartada.¹⁰⁵

Neste trabalho, em estudo piloto inicial, foi possível explorar as subpopulações de linfócitos, e demonstrar que estas são distribuídas de forma diversa entre pacientes infartados e controles, mesmo que o número total de linfócitos não seja diferente entre os dois grupos. Este resultado é mantido mesmo após 30 dias do infarto, demonstrando que a diferença não ocorre apenas pela resposta inflamatória imediata gerada pela obstrução coronariana.

O número de leucócitos dos pacientes com IAMCST diminuiu após 30 dias, sugerindo estabilização do processo inflamatório. A maior quantidade de leucócitos nos pacientes com IAM em relação aos controles já era esperada, pois a dor e ansiedade do infarto gera descarga adrenérgica que, na medula óssea, aumenta a atividade e migração de células tronco hematopoiéticas para placas, o que poderia explicar, inclusive, a maior incidência de reinfarto.^{106,102} A relação entre número de leucócitos totais e a maior gravidade de doença coronariana foi levantada por Sabatine e colaboradores¹⁰⁷, embora o estudo tenha sido realizado em pacientes com angina instável e IAMSST.

Inicialmente, formulamos a hipótese de que haveria um desequilíbrio entre as subpopulações de linfócitos B nos pacientes infartados, possivelmente naqueles considerados pró-inflamatórios,¹⁰⁵ ou seja, as células B clássicas (B2) e que expressassem o receptor TLR4. De fato, encontramos diferença entre os grupos: células B2 positivas para TLR4 tem maior número absoluto nos pacientes com IAMCST, mas também de linfócitos B1, que apesar de ser uma população pequena, aparenta ter influência na lesão/ cicatrização do infarto. Maior número absoluto de linfócitos BTLR4⁺ nos infartados sugere um possível mecanismo para os títulos de IgM, talvez por uma resposta rápida às moléculas expostas com a ruptura da placa, como a LDL-ox e debris celulares, independente da apresentação de antígeno.

A influência de anticorpos contra antígenos miocárdicos, especialmente dos anticorpos naturais, na lesão ou reparo do tecido infartado ainda não está bem estabelecida.¹⁰⁸ Neste trabalho, o anticorpo IgM esteve em maior concentração nos pacientes infartados, mesmo após 30 dias, sugerindo possível papel na cicatrização da lesão. Em teoria, a IgM teria potencial participação protetora na evolução do infarto, por facilitar o clareamento de debris da placa com erosão ou rompida.³² Nosso estudo sugere que a IgM plasmática total circulante nos pacientes IAMCST tem a contribuição do linfócito B1, que é um linfócito considerado protetor.^{57,58} Entretanto, não conseguimos demonstrar nenhuma associação deste anticorpo com a massa infartada ou a função de VE.

Além disto, evidenciamos que os linfócitos B1, identificados pelo fenótipo descrito por Griffin⁴³ CD20⁺CD19⁺CD27⁺CD43⁺ nos pacientes IAMCST, mantem as características descritas pelo linfócito B1 em modelo experimental: produzem espontaneamente IgM e estão associados à produção IL-10. Como já exposto, esta subpopulação está ligada a um papel antiaterogênico em modelos de aterosclerose.

Esperávamos encontrar dado semelhante nos pacientes infartados, mas de forma surpreendente e pioneira, demosmos que apenas a subpopulação de linfócito B1CD11b⁺, que é uma célula ligada a expansão de células T, teve correlação significativa, embora de pequena magnitude, com a massa de fibrose. Os linfócitos B1, população muito escassa no sangue periférico (menor que 1%) além de seu papel na produção de IgM, também tem capacidade de estimular os linfócitos TCD4⁺. A molécula CD11b⁺ quando expressa em macrófagos possibilita a interação destes com integrinas do endotélio, permitindo assim a entrada na íntima vascular.²² Poderíamos especular que um mecanismo semelhante favoreceria maior lesão miocárdica por facilitar infiltração celular e interações locais com as células T já recrutadas, provocando maior expansão clonal das células TCD4⁺, que sabidamente, estão presentes em grande quantidade nas placas ateroscleróticas.¹⁰⁹

Já os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ não apresentaram diferenças entre os grupos, como em alguns estudos publicados.^{29,110} A população de linfócitos TCD8 não se modificou nos primeiros 30 dias do IAM, o que pode sugerir um menor papel destas células no contexto do IAM. Linfócitos TCD4⁺ apresentaram diminuição na contagem de células aos 30 dias, talvez por seu recrutamento não só na área do infarto, como também em outros sítios de aterosclerose; ou devido a maior expressão de citocinas ateroprotetoras.

Como já consolidado na literatura, as citocinas tem papel fundamental no controle da resposta inflamatória. De acordo com conjunto de citocinas, o processo pode ser modulado, para sua exacerbação ou resolução.²² Nossos dados em relação as citocinas detectadas em sobrenadante de cultura dos linfócitos T mostraram uma clara predominância de um perfil Th1 nos linfócitos T dos pacientes infartados, e apenas a IL-6 secretada foi diferente, aumentando em 30 dias. A associação negativa do linfócito TCD4⁺ com IL-4 reforça esta hipótese. O aumento das citocinas IL-4 e IL-10 após 30 dias do IAMCST sugere a polarização para a cicatrização da lesão miocárdica, embora tenha sido incapaz de modular a massa de fibrose. Esperávamos encontrar concomitante queda da IL-6, o que não ocorreu. Esta foi a única citocina com associação significativa com a massa de infarto e com a função do VE. Estes resultados confirmam dados da literatura,⁶⁴ demonstrando seu papel pró-inflamatório e deletério na lesão de reperfusão.

A falta de associação da PCRas com parâmetros RNM cardíaca no trigésimo dia, também está de acordo com a literatura, embora existam dados de associação

da PCR com massa de infarto após dois dias intervenção percutânea.¹¹¹ Entretanto, este último foi um estudo menor, com 42 pacientes. Aqui, a falta de associação da PCRas com parâmetros RNM cardíaca tanto na fase aguda como aos 30 dias, sugere que este parece ser um marcador de inflamação, mas sem provável influência direta na lesão do infarto.¹¹² A associação positiva da PCRas com IL-6, única correlacionada à fibrose do VE, fundamenta ainda mais seu uso para acesso ao “status” inflamatório dos pacientes e possível escolha do caminho para otimização terapêutica.²⁵ Esta associação era esperada, pois a produção de PCR pelo fígado é parcialmente estimulada pela IL-6.¹¹¹

Embora exista relato da influência da atorvastatina em linfócitos T reguladores (Treg=CD4⁺CD25⁺)¹¹³, nossos resultados demonstraram que rosuvastatina e a combinação de sinvastatina com ezetimiba, apesar de seu reconhecido papel pleiotrófico e anti-inflamatório, não foram capazes de influenciar as subpopulações de linfócitos, independentemente da combinação instituída.

Como limitações, pontuamos o curto tempo de acompanhamento dos pacientes, 30 dias, embora este seja o período crítico para definição da massa infartada final.²² A maioria de nossos pacientes recebeu “stents”, o que pode deflagrar modificações na resposta inflamatória ²⁹ e influenciar os achados descritos. Além disto, os dados comparativos com pacientes controles devem ser confirmados em estudo desenhado para esta finalidade.

A intervenção na imunidade representa uma nova estratégia terapêutica para a doença coronária em adição ao tratamento convencional, com potencial de limitar o tamanho do infarto e portanto melhorar a sobrevida dos pacientes IAMCST. A partir de nossos dados, sugerimos novo alvo de investigação no contexto IAMCST: linfócitos B1CD11b⁺.

6 CONCLUSÕES

Apenas a subpopulação B1CD11b+, no primeiro dia do infarto, apresentou associação positiva com a massa de infarto quantificada por RNM cardíaca, originando possível novo alvo para imunomodulação no contexto IAMCST.

No primeiro dia IAMCST, as células B1 totais, estão associadas com IL-10 plasmática, envolvendo ambos os subtipos de B1: B1CD11b- e B1CD11b+. Não detectamos relação entre IL-10, IL-6 ou IL-4 e os linfócitos B clássicos. No trigésimo dia do infarto, houve associação negativa do linfócito B clássicos com IL-10, enquanto para os linfócitos B1, encontramos correlação positiva com IL-4 e negativa com IL-6, envolvendo apenas o subtipo B1CD11b-. Este conjunto de dados sugere que os linfócitos B apresentam papel dual também no contexto com IAMCST, como demonstrado experimentalmente em modelos de aterosclerose.

Não identificamos associação do anticorpo IgM com massa de infarto ou com a função do ventrículo esquerdo.

As estatinas não influenciaram as subpopulações de linfócitos B ou T após 30 dias de tratamento, mesmo analisando-se subpopulações pró-inflamatórias de linfócitos B, aqueles que expressam o receptor TLR4.

Apenas a IL-6 secretada no sobrenadante de cultura dos linfócitos T aumentou após 30 dias do evento. O nível de IL-6 plasmática em D1 foi o único relacionado com os parâmetros da RNM cardíaca.

Assim, mesmo após reperfusão precoce, a massa infartada final aos 30 dias e a função ventricular parecem estar relacionadas com a resposta inflamatória.

7 REFERÊNCIAS

- 1) Departamento de informática do sistema único de saúde (DATASUS) [internet] [cited 2019 feb 08] Available from <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>
- 2) Departamento de informática do sistema único de saúde (DATASUS) [internet] [cited 2019 feb 08]. Available from <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>
- 3) Ribeiro ALP, Duncan B, Brant LC, et al. Cardiovascular Health in Brazil Trends and Perspectives. *Circulation* 2016; 133:422-33
- 4) World Health Organization (WHO) [internet] [cited 2019 feb 02] Disponível em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- 5) Zheng Z-J, Croft JB, Giles WH et al. Sudden Cardiac Death in the United States, 1989 to 1998. *Circulation*. 2001;104:2158-2163
- 6) Piegas LS, Timerman A, Feitosa GS et al. V Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Tratamento do Infarto Agudo do Miocárdio com Supradesnível do Segmento ST. *Arq Bras Cardiol*. 2015; 105(2):1-105
- 7) O'GaraPT, Kushner FG, Ascheim DD et al. 2013 ACCF/AHA Guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* Jan 2013, 61 (4) e78-e140
- 8) Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report from the American Heart Association. *Circulation*. 2017 Mar 7; 135(10):e146-e603
- 9) Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM et al. The wavefront phenomenon of ischemic cell death: 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977 Nov;56(5):786-94

- 10) Weir RA, McMurray JJ, Velazquez EJ. Epidemiology of heart failure and left ventricular systolic dysfunction after acute myocardial infarction: prevalence, clinical characteristics, and prognostic importance. *Am J Cardiol* 2006;97:Suppl 10A:13F-25F.
- 11) Pinto DS, Kirtane AJ, Nallamothu BK, et al. Hospital delays in reperfusion for ST-elevation myocardial infarction: implications when selecting a reperfusion strategy. *Circulation* 2006;114(19):2019-25.
- 12) Armstrong PW, Gershlick AH, Goldstein P, et al. STREAM Investigative Team. Fibrinolysis or primary PCI in ST-segment elevation myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2013;368(15):1379-87
- 13) Sinnaeve PR, Armstrong PW, Gershlick AH, et al. ST-segment-elevation myocardial infarction patients randomized to a pharmaco-invasive strategy or primary percutaneous coronary intervention: Strategic Reperfusion Early After Myocardial Infarction (STREAM) 1-year mortality follow-up. *Circulation*. 2014;130(14):1139-45.
- 14) Biasucci LM, Biasillo G, Stefanelli A. Inflammatory markers, cholesterol and statins: pathophysiological role and clinical importance. *Clin Chem Lab Med* 2010;48(12):1685–91
- 15) Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
- 16) Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease *N Engl J Med*. 2017 Sep 21: 377(12):1119-1131.
- 17) Ross R, Wight TN, Strandness E, et al. Human atherosclerosis. I. Cell constitution and characteristics of advanced lesions of the superficial femoral artery. *Am J Pathol*. 1984 Jan;114(1):79-93.

- 18) Jonasson L, Holm J, Skalli O, et al. Expression of class II transplantation antigen on vascular smooth muscle cells in human atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1985; 76(1):125-31
- 19) Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.107p
- 20) Ponnuswamy P, Van Vré EA, Mallat Z, et al. Humoral and cellular immune responses in atherosclerosis: Spotlight on B- and T-cells. *Vascular Pharmacology* 2012; May-Jun 56(5-6):193-203
- 21) Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 2002, 105:1135-1143
- 22) Bonaventura A, Montecucco F, Dallegri F. Cellular recruitment in myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Eur J Clin Invest*. 2016 Jun;46(6):590-601
- 23) Ridker PM. Residual inflammatory risk: addressing the obverse side of the atherosclerosis prevention coin. *Eur Heart J*. 2016 Jun 7;37(22):1720-2
- 24) Ridker PM, Rifai N, Rose L et al. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002; Nov 14 347(20):1557-65.
- 25) Bohula EA, Giuliano RP, Cannon CP et al. Achievement of dual low-density lipoprotein cholesterol and high-sensitivity C-reactive protein targets more frequent with addition of ezetimibe to simvastatin and associated with better outcomes in IMPROVE-IT. *Circulation* 2015;132:1224-33
- 26) Nidorf SM, Eikelboom JW, Budgeon CA. Low-Dose colchicine for secondary prevention of cardiovascular disease. *JACC*. 2013 Jan 61(4):404–10

- 27) Moreira DM, Viera JL, Gottschall CA. The effects of methotrexate therapy on the physical capacity of patients with ischemic heart failure: a randomized double-blind placebo-controlled trial (METIS trial). *J Card Fail.* 2009 Dec;15(10):828-34
- 28) Horckmans M, Ring L, Duchene J, et al. Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype. *Eur Heart J* 2017 Jan 14;38(3):187-197
- 29) Forteza MJ, Trapero I, Hervas A et al. Apoptosis and Mobilization of Lymphocytes to Cardiac Tissue Is Associated with Myocardial Infarction in a Reperfused Porcine Model and Infarct Size in Post-PCI Patients. *Oxid Med Cell Longev.* 2018 Mar 18;2018:1975167
- 30) Braunwald E et al. Braunwald: Tratado de Doenças Cardiovasculares. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 2 v.p1209
- 31) Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res.* 2012 Jan 6;110(1):159-73
- 32) Kaya Z, Leib C, Katus HA. Autoantibodies in Heart Failure and Cardiac Dysfunction. *Circ Res*, 2012 Jan 6; 110(1):145-58
- 33) Mesquita junior D, Araújo JA, Catelan TT, et al. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev. Bras. Reumatol* 2010; 50(5): 552-80. Portuguese, English
- 34) Sindhava VJ, Bondada S. Multiple regulatory mechanisms control B-1 B cell activation. *Front Immunol.* 2012 Dec 17;3:372.
- 35) Rovituso D, Heller S, Schroeter M, et al. B1 cells are unaffected by immune modulatory treatment in remitting-relapsing multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 2014 Jul 15;272(1-2):86-90.

- 36) Suchanek O, Sadler R, Bateman EA, et al. Immunophenotyping of putative human B1 B cell in healthy controls and common variable immunodeficiency (CIVD) patients Clin Exp Immunol 2012 Dec; 170(3): 333–341
- 37) Pone EJ, Lou Z, Lam T et al. B cell TLR1/2, TLR4, TLR7 and TLR9 interact in induction of class switch DNA recombination: modulation by BCR and CD40, and relevance to T-independent antibody responses. Autoimmunity 2015 Feb;48(1):1-12
- 38) Kaper JC, Jager SCA, Ewing MR et al. An Unexpected intriguing effect of toll-like receptor regulator RP105 (CD180) on atherosclerosis formation with alterations on B-cell activation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2013 dez :2810-17
- 39) Mussalem JS, Squaiella-Baptistão CC, Teixeira D, et al. Adjuvant Effect of Killed Propionibacterium acnes on Mouse Peritoneal B-1 Lymphocytes and Their Early Phagocyt Differentiation. Plos One 2012 Mar 7 (3): e33955
- 40) Lee JH, Noh J, Noh G, et al. Allergen-specific B cell subset responses in cow's milk allergy of late eczematous reactions in atopic dermatitis. Cell Immunol. 2010;262(1):44-51
- 41) Polese L, Boetto R, De Franchis G, et al. B1a lymphocytes in the rectal mucosa of ulcerative colitis patients. World J Gastroenterol. 2012 Jan 14;18(2):144-9
- 42) Youinou P, Renaudineau Y. The paradox of CD5-expressing B cells in systemic lupus erythematosus. Autoimmun Rev. 2007 Dec;7(2):149-54.
- 43) Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+CD27+CD43+CD70. J Exp Med 2011; 208(1):67-80
- 44) Weller S, Descatoire M. Les lymphocytes B IgM+IgD+CD27+ chez l'homme Un rôle essentiel dans la défense contre les bactéries encapsulées médecine.Sciences 2015; 31 : 647-53. French.

- 45) Griffin DO e Rothstein TL. A small CD11b⁺ human B1 cell subpopulation stimulates T cells and is expanded in lúpus. J Exp Med 2011 Dec 19;208(13):2591-8.
- 46) Griffin DO, Quach T, Batliwalla F, et al. Human CD11b⁺ B1 cells are not monocytes: A reply to “Gene profiling of CD11b⁺ and CD11b⁻ B1 cell subsets reveals potential cell sorting artifacts”. J Exp Med 2012;209(3):434-436.
- 47) Santos-Argumedo L. Diversidad fenotípica y funcional de los linfocitos B Revista Alergia México 2015;62:302-11. Espanhol
- 48) Ping Shen and Simon Fillatreau. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. Nature Reviews immunology 2015 jul 15: 441-51
- 49) Caligiuri G, Nicoletti A, Poirier B, et al. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. J Clin Invest 2002 109:745–53
- 50) Major AS, Fazio S, Linton MS. B-Lymphocyte Deficiency Increases Atherosclerosis in LDL Receptor-Null Mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2002, 22:1892-1898
- 51) Ait-Oufella H, Herbin O, Bouaziz JD, et al. B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice. J Exp Med 2010; 207:1579–87
- 52) Zouggari Y, Ait-Oufella H, Bonnin P. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. Nat Med. 2013 Oct; 19(10): 1273–1280.
- 53) Kyaw T. et al Conventional B2 B Cell Depletion Ameliorates whereas Its Adoptive Transfer Aggravates Atherosclerosis J Immunol 2010;185;4410-19
- 54) Mischa A. Houtkamp, Onno J. de Boer, et al. Adventitial infiltrates associated with advanced atherosclerotic plaques: structural organization suggests generation of local humoral immune responses. Journal of Pathology 2001; 193: 263-69

- 55) Kyaw T, Tipping P, Ban-Hock T, et al. A Current understanding of the role of B cell subsets and intimal and adventitial B cells in atherosclerosis. *Curr ent Opinion Lipidology* 2011, 22:373–379
- 56) Tsou CL, Peters W, Si Y et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites *J Clin Invest.* 2007;117(4):902-909
- 57) Tsiantoulas D, Diehl CJ, Witztum JL, et al. B Cells and Humoral Immunity in Atherosclerosis. *Circ Res* 2014 May 23;114(11):1743-56.
- 58) Tsiantoulas D, Sage PA, Mallat Z and Binder CJ Targeting B cells in Atherosclerosis: closing the gap from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35:296-30
- 59) Ding C, Ma Y, Chen X, et.al. Integrin CD11b negatively regulates BCR signaling to maintain autoreactive B cell tolerance. *Nat Commun.* 2013;4:2813
- 60) Fragoso Lona JM, Sierra Martínez M, Vargas Alarcón G e tal .Tumor necrosis factor alfa in cardiovascular diseases: molecular biology and genetics. *Gac Med Mex.* 2013 Sep-Oct;149(5):521-30.Espanhol
- 61) Springall R, Amezcua-Guerra LM, Gonzalez-Pacheco H et al. Interferon-gamma increases the ratio of matrix metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in peripheral monocytes from patients with coronary artery disease. *PLoS One.* 2013 Aug 12;8(8):e72291.
- 62) Kehmeier ES, Lepper W, Kropp M et al. TNF- α , myocardial perfusion and function in patients with ST-segment elevation myocardial infarction and primary percutaneous coronary intervention. *Clin Res Cardiol.* 2012 Oct;101(10):815-27
- 63) Ritschel VN, Seljeflot I, Arnesen H et al.IL-6 signalling in patients with acute ST-elevation myocardial infarction. *Results Immunol.* 2013 Dec 14;4:8-13.

- 64) Ritschel VN, Seljeflot I, Arnesen H, et al. Circulating Levels of IL-6 Receptor and gp130 and Long-Term Clinical Outcomes in ST-Elevation Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc.* 2016 Jun 13;5(6)
- 65) Ridker P, Libby P, MacFadyen JG et al. Modulation of the interleukin-6 signalling pathway and incidence rates of atherosclerotic events and all-cause mortality: analyses from the Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *European Heart Journal* (2018) 39, 3499–3507
- 66) Peng H, Sarwar Z, Yang XP et al. Profibrotic Role for Interleukin-4 in Cardiac Remodeling and Dysfunction. *Hypertension.* 2015 Sep;66(3):582-9
- 67) Goldwater D, Karlamangla A, Merkin SS et al. Interleukin-10 as a predictor of major adverse cardiovascular events in a racially and ethnically diverse population: Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Ann Epidemiol.* 2018 Sep 5: S1047-2797(18)30508-8
- 68) Ammirati E, Cannistraci CV, Cristell NA et al. Identification and predictive value of interleukin-6+ interleukin-10+ and interleukin-6- interleukin-10+ cytokine patterns in ST-elevation acute myocardial infarction. *Circ Res.* 2012 Oct 26;111(10):1336-48
- 69) Mälarstig A, Eriksson P, Hamsten A et al. Raised interleukin-10 is an indicator of poor outcome and enhanced systemic inflammation in patients with acute coronary syndrome. *Heart.* 2008 Jun;94(6):724-9
- 70) Zarrouk-Mahjoub S, Zaghdoudi M, Amira Z et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines in post-infarction left ventricular remodeling. *Int J Cardiol.* 2016 Oct 15;221:632-6
- 71) Szkodzinski J, Hudzik B, Osuch M et al. Serum concentrations of interleukin-4 and interferon-gamma in relation to severe left ventricular dysfunction in

patients with acute myocardial infarction undergoing percutaneous coronary intervention. *Heart Vessels*. 2011 Jul;26(4):399-407

- 72) Xiao J, Yu K, Li M et al. The IL-2/Anti-IL-2 Complex Attenuates Cardiac Ischaemia-Reperfusion Injury Through Expansion of Regulatory T Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44(5):1810-1827
- 73) Danikiewicz A, Szkodziński J, Hudzik B et al. Effects of trimetazidine on interleukin-2 and interleukin-8 concentrations in patients with coronary artery disease. *Can J Physiol Pharmacol*. 2017 Jun;95(6):759-762
- 74) Gonzalez J, Kramer C. Role of Imaging Techniques for Diagnosis, Prognosis and Management of Heart Failure Patients: Cardiac Magnetic Resonance. *Curr Heart Fail Rep*. 2015 August ; 12(4): 276–283.
- 75) De Waha S, Desch S, Eitel I et al. Impact of Ejection Fraction on longterm outcome after ST-Elevation Myocardial Infarction – comparison between cardiac magnetic resonance imaging and transthoracic echocardiography. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* 2012 14 (Suppl 1):O15
- 76) McGeoch RJ, Payne AR, Woodward R et al. Diagnostic utility of cardiac magnetic resonance imaging in STEMI survivors after emergency PCI. *Int J Cardiol* 2013 Oct 3;168(3):2933-4
- 77) Larose E, Rodes-Cabau J, Pibarot P, Rinfret S, Proulx G, Nguyen CM, et al. Predicting late myocardial recovery and outcomes in the early hours of ST-segment elevation myocardial infarction traditional measures compared with microvascular obstruction, salvaged myocardium, and necrosis characteristics by cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol*. 2010; 55:2459–69
- 78) McCrohon JA, Moon JC, Prasad SK, McKenna WJ, Lorenz CH, Coats AJ, et al. Differentiation of heart failure related to dilated cardiomyopathy and coronary artery disease using gadolinium-enhanced cardiovascular magnetic resonance. *Circulation*. 2003; 108:54–9.

- 79) Lipinski MJ, McVey CM, Berger JS, Kramer CM, Salerno M. Prognostic value of stress cardiac magnetic resonance imaging in patients with known or suspected coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2013; 62:826–38.

- 80) Fonseca FA. Farmacocinética das estatinas. *Arq Bras Cardiol.* 2005 Oct vol 85 Sup V:9-14

- 81) Bruder-Nascimento T, Callera GE, Montezano AC, et al. Atorvastatin inhibits pro-inflammatory actions of aldosterone in vascular smooth muscle cells by reducing oxidative stress. *Life Sciences* 2019; 221:29–34

- 82) Bahramia A, Parsamanesh N, Atkinson SL et al. Effect of statins on toll-like receptors: a new insight to pleiotropic effects. *Pharmacological Research* 2018;135: 230–238

- 83) Kavalipati N, Shah J, Ramakrishnan A, Vasawala H. Pleiotropic effects of statins. *Indian J Endocrinol Metab.* 2015 Sep-Oct.19 (5):554-62.

- 84) Fonseca FAH, Izar MC, Maugeri IML et al. Effects of four antiplatelet/statin combined strategies on immune and inflammatory responses in patients with acute myocardial infarction undergoing pharmacoinvasive strategy: Design and rationale of the B and T Types of Lymphocytes Evaluation in Acute Myocardial Infarction (BATTLE-AMI) study: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2017 Dec 19;18(1):601

- 85) Cerqueira MD, Weissman NJ, Dilsizian V, et al. Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart: A statement for healthcare professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association. *Circulation* 2002 Jan 29;105(4):539-42

- 86) Kramer CM. Integrated approach to ischemic heart disease. The one-stop shop. *Cardiol Clin* 1998;16:267-76
- 87) Gudmundsson P, Winter R, Dencker M, et al. Real-time perfusion adenosine stress echocardiography versus myocardial perfusion adenosine scintigraphy for the detection of myocardial ischaemia in patients with stable coronary artery disease. *Clin Physiol Funct Imag* 2006, 26:32-8.
- 88) Stork A, Muellerleile K, Bansmann PM, et al. Value of T2-weighted, first-pass and delayed enhancement, and cine CMR to differentiate between acute and chronic myocardial infarction. *Eur Radiol* 2007;17(3):610-7.
- 89) Knopp MV, Schoenberg SO, Rehm C, et al. Assessment of gadobenate dimeglumine for magnetic resonance angiography: phase I studies. *Invest Radiol* 2002;37(12):706-15
- 90) McCrohon JA, Moon JC, Prasad SK, et al. Differentiation of heart failure related to dilated cardiomyopathy and coronary artery disease using gadolinium-enhanced cardiovascular magnetic resonance. *Circulation* 2003 Jul 8;108(1):54-59
- 91) Vohringer M, Mahrholdt H, Yilmaz A, Sechtem U. Significance of late gadolinium enhancement in cardiovascular magnetic resonance imaging (CMR). *Herz* 2007;32(2):129-37.
- 92) Mahrholdt H, Wagner A, Judd RM, et al. Delayed enhancement cardiovascular magnetic resonance assessment of non-ischaemic cardiomyopathies. *Eur Heart J* 2005;26(15):1461-74
- 93) Weinsaft JW, Klem I, Judd RM. MRI for the assessment of myocardial viability *Cardiol Clin* 2007;25(1):35-56.

- 94) Sparrow P, Messroghli DR, Reid S, et al. Myocardial T1 mapping for detection of left ventricular myocardial fibrosis in chronic aortic regurgitation: pilot study. *AJR Am J Roentgenol*. 2006;187(6):W630–W635
- 95) Messroghli DR, Greiser A, Fröhlich M, et al. Optimization and validation of a fully-integrated pulse sequence for modified look-locker inversion-recovery (MOLLI) T1 mapping of the heart. *J Magn Reson Imaging*. 2007 Oct;26(4):1081-6.
- 96) Albert TS, Kim RJ, Judd RM. Assessment of no-reflow regions using cardiac MRI. *Basic Res Cardiol* 2006 Sep ;101(5): 383-390
- 97) Weir RA, Murphy CA, Petrie CJ, et al. Microvascular obstruction remains a portent of adverse remodeling in optimally treated patients with left ventricular systolic dysfunction after acute myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2010 Jul;3(4):360-7
- 98) Wu KC. CMR of microvascular obstruction and hemorrhage in myocardial infarction. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2012 Sep 29;14:68
- 99) Siegel S. Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, 448p
- 100) Field A. Descobrindo a estatística usando SPSS. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009, 688p
- 101) Faludi AA, Izar MCO, Saraiva JFK, Chacra APM, Bianco HT, Afiune Neto A et al. Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017. *Arq Bras Cardiol* 2017; 109(2Supl.1):1-76

- 102) Joshi NV, Toor I, Shah AS, et al. Systemic Atherosclerotic Inflammation Following Acute Myocardial Infarction: Myocardial Infarction Begets Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc.* 2015; 4 (9):e001956.
- 103) Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*, 2010 Feb;125 (2 Suppl 2):S3-23
- 104) Tsiantoulas D, Sage AP, Göderle L, et al. B Cell-Activating Factor Neutralization Aggravates Atherosclerosis. *Circulation.* 2018;138 (20):2263-2273.
- 105) Santos-Zas I, Lemarie J, Tedgui A and Ait-Oufella H. Adaptive immune responses contribute to post-ischemic cardiac remodeling. *Front Cardiovasc Med.* 2019 Jan 10;5:198
- 106) Swirski FK e Nahrendorf M .Leucocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science* 2013 jan: 339;161-6
- 107) Sabatine MS, Morrow DA, Cannon CP, et al. Relationship between baseline white blood cell count and degree of coronary artery disease and mortality in patients with acute coronary syndromes: a TACTICS-TIMI 18 (Treat Angina with Aggrastat and determine Cost of Therapy with an Invasive or Conservative Strategy- Thrombolysis in Myocardial Infarction 18 trial) substudy. *J Am Coll Cardiol* 2002 Nov 20;40(10):1761-8.
- 108) Hofmann U, Frantz S. Role of lymphocytes in myocardial injury, healing, and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res.* 2015 Jan 16;116(2):354-67
- 109) Paul VS, Paul CM, Kuruvilla S. Quantification of Various Inflammatory Cells in Advanced Atherosclerotic Plaques. *J Clin Diagn Res.* 2016;10 (5):EC35-8
- 110) Zhong Z, Wu H, Zhang Q, Zhong W, Zhao P. Characteristics of T cell receptor repertoires of patients with acute myocardial infarction through high-throughput sequencing. *J Transl Med.* 2019;17 (1):21

- 111) Orn S, Manhenke C, Ueland T et al. C-reactive protein, infarct size, microvascular obstruction, and left-ventricular remodelling following acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2009 May;30(10):1180-6
- 112) Vanhaverbeke M, Veltman D, Pattyn N, et al. C-reactive protein during and after myocardial infarction in relation to cardiac injury and left ventricular function at follow-up. *Clin Cardiol*. 2018;41 (9):1201-1206.
- 113) Zhang D, Wang S, Guan Y et al. Effect of oral atorvastatin on CD4+CD25+ regulatory T cells, FoxP3 expression, and prognosis in patients with ST-segment elevated myocardial infarction before primary percutaneous coronary intervention. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011 May;57(5):536-41
- 114) Normas para teses e dissertações [Internet]. 2ª ed. rev. e corrigida. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Biblioteca Antônio Rubino de Azevedo, Coordenação de Cursos; 2015 [cited 2015 nov 11]. Available from:<http://www.bibliotecacsp.unifesp.br/Documentos-Apostila/normas-para-teses-e-dissertacoes>

8 ANEXOS

Anexo 1- Termo de consentimento livre e esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – Escola Paulista de Medicina
Setor de Lipídes, Aterosclerose e Biologia Vascular

Prof. Dr. Francisco Antonio Helfenstein Fonseca (Pesquisador Principal)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do estudo: Papel da imunidade inata e adaptativa na evolução do infarto agudo do miocárdio

Iniciais do indivíduo: _____

Prezado (a)

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Antes que o senhor (a) decida se irá ou não participar, é importante que entenda o motivo pelo qual está sendo feito este estudo, como seus dados serão usados, possíveis benefícios, riscos e desconfortos. Por favor, reserve um tempo para ler com atenção as seguintes informações e tire suas dúvidas com o seu médico, caso achar necessário. O senhor (a) receberá uma cópia deste termo de consentimento assinada e com páginas rubricadas pelo pesquisador principal. Também será necessário que o senhor (a) assine uma cópia do termo caso decida participar e rubrique todas as páginas.

QUAL O OBJETIVO DESTE ESTUDO?

O senhor (a) foi selecionado, pois já sofreu um infarto agudo do miocárdio. Atualmente o tratamento tem sido baseado na abertura da artéria coronária ocluída (total ou parcialmente) por meio de substâncias que dissolvem o coágulo, em geral complementada por tratamento por cateter e, quando indicado, com a inserção de um *stent* (um estrutura de metal que mantém a artéria coronária expandida, permitindo um melhor fluxo de sangue para a região do infarto). Todo este tratamento que é recomendado para o infarto agudo do miocárdio será realizado, bem como os medicamentos que habitualmente são utilizados nesta situação. O que este estudo pretende é examinar os efeitos de combinações de medicamentos aprovados para o tratamento do infarto para verificar possível benefício adicional na redução da área do infarto. Esta possível redução na área do infarto será quantificada por meio de um exame de imagem do coração que é a ressonância nuclear magnética. Serão realizados três destes exames, o primeiro dentro dos primeiros três dias do infarto, o segundo após quatro semanas e o último após seis meses. Durante todo este período o senhor (a) será acompanhado pela equipe de cardiologistas da Escola Paulista de Medicina e todos os tratamentos que se fizerem necessários, como novas intervenções com *stents* ou cirurgias serão realizadas. Espera-se no entanto, que as complicações do infarto sejam reduzidas pelo atendimento inicial e acompanhamento médico. Durante estes seis meses serão coletadas amostras de sangue e urina para exames de rotina e pesquisas destinadas a melhor compreensão da evolução clínica no pós-infarto.

Durante o estudo serão fornecidos medicamentos como a rosuvastatina ou sinvastatina (redutores de colesterol) e clopidogrel ou ticagrelor (antiplaquetários, medicamentos que afinam o sangue para evitar trombozes). Estes medicamentos serão fornecidos sem custo e são aprovados para tratamento do infarto, cada paciente receberá um redutor do colesterol e um antiplaquetário. O Sr (a) poderá receber outros medicamentos como aspirina, medicamentos para controle de diabetes ou da hipertensão ou da insuficiência cardíaca que se fizerem necessários, todos eles permitidos ao longo do estudo de acordo com a necessidade de cada paciente.

Quais estudos serão realizados

Versão3_21_06_2017
paciente _____

pesquisador _____



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – Escola Paulista de Medicina
Setor de Lípidos, Aterosclerose e Biologia Vascular**

Prof. Dr. Francisco Antonio Helfenstein Fonseca (Pesquisador Principal)

A aterosclerose (entupimento das artérias por colesterol) e rompimento da placa de aterosclerose que causa infarto (por coágulos que entopem a artéria) estão associados com inflamação na parede dos vasos. O Sr (a) será submetido a coletas de sangue e exames de ressonância nuclear magnética, que permite quantificar o tamanho do infarto e as repercussões sobre o funcionamento do coração, o quanto o infarto comprometeu a função de bombeamento do sangue. Espera-se que o tratamento possa reduzir a área de infarto, melhorando a capacidade de bombeamento do sangue e tornando menos provável repercussões do infarto, como falta de ar e inchaços. Nenhum grupo de pacientes receberá placebo, todos tomarão medicamentos ativos e aprovados para uso no infarto do miocárdio.

Neste estudo, várias análises serão realizadas, entre elas mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de *diabetes mellitus* tipo 2 e obesidade, onde a microbiota intestinal é considerada como fator importante para a contribuição destes mecanismos. O aumento de bactérias probióticas do tipo bifidobactérias, parece ser claramente eficaz na redução dos níveis de lipopolissacarídeos, que são desencadeadores de processos inflamatórios, além de melhorar a função da barreira intestinal.

Neste estudo vamos analisar se mudanças na flora intestinal, através da administração de probióticos (microrganismos vivos que conferem benefícios a saúde), produzem benefícios ao metabolismo lipídico e a sensibilidade da insulina. Os probióticos serão fornecidos sem custo e contém bactérias consideradas saudáveis para nosso intestino, que estão presentes em alguns alimentos como iogurtes. Por meio de exames de fezes, serão identificadas as bactérias que formam sua flora intestinal. Acredita-se que algumas bactérias de pacientes com obesidade ou diabetes produzam produtos de metabolismo a partir de alimentos de nossa dieta que causam inflamação e entupimento de nossas artérias.

Os probióticos podem produzir benefícios como redução nos níveis plasmáticos de frações do colesterol, melhora na sensibilidade à insulina e ainda melhora na qualidade de vida, por meio de redução de peso, já que o senhor será também acompanhado por uma nutricionista.

As análises de sangue permitirão quantificar alguns produtos de nosso metabolismo que possam estar implicados em uma evolução menos favorável da doença coronariana. Neste aspecto, examinaremos os glóbulos brancos e sua capacidade de produzir anticorpos e substâncias inflamatórias. Todas estas análises serão feitas com base na coleta de amostra de sangue, de urina e de fezes.

EU SOU OBRIGADO A PARTICIPAR?

Sua participação é voluntária. Caso decida participar, terá que assinar um termo de consentimento livre e esclarecido. Após o início do estudo, o senhor (a) poderá desistir a qualquer momento. Seu médico será informado sobre sua participação no estudo, caso desejar. O médico do estudo poderá decidir que a sua permanência com o uso de redutores de colesterol, antiplaquetários ou probióticos pode não ser a melhor opção de tratamento, e o senhor (a) poderá ser retirado do estudo e orientado para outra forma de tratamento. Se o senhor (a) parar de tomar o probiótico ou as medicações do estudo ainda deverá vir à clínica ou hospital para fazer as consultas já marcadas até o final do estudo. Caso não possa comparecer, receberá uma ligação telefônica nas datas das consultas para que a equipe do estudo possa obter informações sobre a sua evolução.

O QUE ACONTECERÁ COMIGO SE EU DECIDIR PARTICIPAR?

O estudo envolverá cinco consultas durante um período de seis meses.

Versão3_21_06_2017
paciente _____

pesquisador _____



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – Escola Paulista de Medicina
Setor de Lipídeos, Aterosclerose e Biologia Vascular**

Prof. Dr. Francisco Antonio Helfenstein Fonseca (Pesquisador Principal)

Primeiramente o senhor (a) fará um exame, onde uma amostra de sangue será coletada (aproximadamente 10 ml, equivalente a uma colher de sopa) para testes de laboratório incluindo parâmetros de controle glicêmico (dosagem de açúcar no sangue), análise de lipídios (gordura no sangue), bioquímica e hematologia clássica (exame das células do sangue), hoje ou na manhã seguinte.

Após análise dos resultados destes exames, o médico decidirá se o Sr (a) apresenta alguma restrição a participar do estudo como contra-indicação para algum procedimento ou medicamento do mesmo. Além disso, verificará se o Sr (a) está em condições clínicas estáveis, ou precisará de outros tratamentos ou cirurgias, impedindo sua participação no estudo.

Caso esteja grávida não poderá participar do estudo.

Após a visita de triagem onde será avaliada a adequação de sua participação no estudo, o senhor (a) será convidado a retornar ao setor cinco outras vezes.

Na primeira visita, um médico da equipe do estudo solicitará que o senhor (a) conte sua história médica. O senhor (a) deverá informar sobre as doenças que já teve, alergias, todos os medicamentos em uso. Nesta visita o senhor (a) será submetido a um exame físico geral: medida da pressão arterial, batimentos cardíacos e alguns exames como medida de gordura corporal (bioimpedância), dados antropométricos.

Todos os medicamentos do estudo serão fornecidos gratuitamente e não haverá medicamento do tipo placebo.

O que devo fazer?

O Senhor (a) deve estar disposto a comparecer às consultas marcadas e fazer os exames ou procedimentos citados. Para as análises de sangue serão necessários jejuns alimentares de aproximadamente 12 horas (os medicamentos devem ser tomados nos horários habituais). O senhor (a) deverá também tomar o medicamento de acordo com as orientações recebidas. O senhor (a) poderá continuar com sua rotina, mas receberá orientação para consumir preferencialmente alimentos mais saudáveis, com menor teor de gorduras e colesterol e maior quantidade de vegetais e cereais.

Quais são os possíveis riscos, prejuízos e benefícios?

Os tratamentos propostos são em geral bem tolerados. Os riscos de sangramentos com o uso de medicamentos antiplaquetários como a aspirina, ticagrelor ou clopidogrel são contrabalançados pelo grande benefício na redução de novos entupimentos nas coronárias ou dos stents e estes medicamentos são aprovados para todos os pacientes que sofrem infarto do miocárdio. Com o uso de estatinas (rosuvastatina ou sinvastatina e ezetimiba) os riscos são ainda menores, em geral associados com dores musculares e muito raramente com miosite mais grave. Novamente os benefícios superam amplamente estes riscos e estes medicamentos foram aprovados para uso em todos os pacientes com infarto do miocárdio. Estes medicamentos estão associados com redução de acidente vascular cerebral, infarto, morte cardiovascular, morte por todas as causas, internações por angina instável e necessidade de revascularização.

Versão3_21_06_2017
paciente_____

pesquisador_____



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – Escola Paulista de Medicina
Setor de Lipídeos, Aterosclerose e Biologia Vascular**

Prof. Dr. Francisco Antonio Helfenstein Fonseca (Pesquisador Principal)

O que acontecerá se eu desistir ou não participar?

Caso o senhor (a) desista ou não queira participar, o senhor (a) terá acompanhamento no nosso ambulatório, com direito a consultas e receitas para manter as medicações ativas em seu tratamento.

Coletas de Sangue

No decorrer do estudo serão feitas coletas de sangue para análise dos resultados do tratamento (aproximadamente 12 mL por coleta). Serão realizadas cinco coletas, além de exames de imagem do coração (ressonância nuclear magnética). O senhor (a) será informado dos resultados. Estes exames permitirão a análise da resposta na redução de colesterol, bem como se o tratamento está diminuindo a inflamação e recuperando a capacidade de produzir anticorpos contra as lipoproteínas oxidadas no sangue e/ou melhorando parâmetros relacionados com diabetes, além de informações sobre o desempenho do coração. Será avaliado se as medicações ajudarão na redução de pequenas partículas circulantes em seu sangue e se as células do sangue (linfócitos), quando cultivadas *in vitro*, terão potencial para produzirem anticorpos contra a oxidação de lipoproteínas no sangue. Além disso, será avaliado o estado de coagulação do sangue e se existe inflamação. O desconforto será o da picada da agulha. Algumas pessoas podem ficar tontas ou desmaiar quando o sangue for coletado. Pode haver a formação de um pequeno hematoma local e muito raramente alguma inflamação (flebite) no lugar em que a veia for puncionada.

Outros exames

O Sr (a) será submetido a uma avaliação da função dos vasos do braço. Será medido o diâmetro da artéria do braço com um aparelho de ultra-som antes e depois de ser insuflado o manguito de pressão por cinco minutos. Nenhuma punção será necessária para este exame. O grau de dilatação da artéria é uma medida de como estão funcionando as células que revestem os vasos sanguíneos e se o tratamento pode ajudar a melhorar o seu funcionamento.

Possíveis interações medicamentosas

Existem alguns remédios que podem interagir com os medicamentos do estudo, entre eles os anticoagulantes, alguns antibióticos, remédios usados para o tratamento de doenças reumáticas ou usadas após transplantes de órgãos, dentre outros. Antes do início do tratamento seu médico irá verificar se o Sr (a) pode ou não tomar outros medicamentos. Caso faça uso de algum remédio que diminua a absorção do medicamento do colesterol (como antiácidos), o medicamento do estudo deverá ser tomado duas horas antes do antiácido.

Quais as vantagens em participar do estudo ?

Este estudo tem como finalidade examinar se o tratamento redutor do colesterol e da trombose (antiplaquetários) também poderão diminuir a deposição de gordura na parede dos vasos sanguíneos (aterosclerose) e reduzir a área de infarto. Estima-se que durante o primeiro mês, após o infarto, uma área do coração permaneça sem o fornecimento de oxigênio e possa ser perdida devido a isquemia. Assim, neste estudo tentaremos recuperar esta área em risco, por meio dos medicamentos propostos, de forma a melhorar a circulação nesta região. Por isso será necessário o exame de ressonância (avaliará esta possível recuperação). Será também avaliado se com o tratamento ocorre diminuição da inflamação, se o sangue mais fino (com

Versão3_21_06_2017
paciente _____

pesquisador _____ Pág 04 de 06



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – Escola Paulista de Medicina
Setor de Lipídeos, Aterosclerose e Biologia Vascular**

Prof. Dr. Francisco Antonio Helfenstein Fonseca (Pesquisador Principal)

menor probabilidade de formar coágulos) e se as células que revestem os vasos reagem melhor aos estímulos da passagem de sangue. Também será analisado se a resposta na redução do colesterol e da coagulação (antiplaquetária) foram satisfatórias e seguras e se o Sr (a) deverá tomar um redutor de colesterol nesta dose ou em dose menor a longo prazo, e também um medicamento para reduzir a trombose da coronária. O Sr (a) receberá informações sobre os medicamentos da pesquisa, caso alguma novidade sobre os mesmos possa afetar a realização da pesquisa.

Caso ocorra algum dano relacionado ao estudo, como serei tratado?

Este projeto é uma iniciativa dos médicos da UNIFESP, não sendo da responsabilidade de laboratórios médicos. Caso ocorra algum efeito adverso requerendo maior atenção médica, o Sr (a) poderá ser assistido no Hospital São Paulo ou na Disciplina de Cardiologia da UNIFESP.

Confidencialidade

Todos os resultados dos exames ou a partir da análise do seu prontuário médico serão confidenciais e utilizados de forma anônima para permitir a análise dos resultados e conclusões do tratamento.

Com quem devo entrar em contato em caso de dúvidas ou problemas de saúde?

Se o Sr (a) tiver dúvidas poderá entrar em contato com o Dr. Francisco A. H. Fonseca (médico no telefone: (11) 9 9263-9082) ou com a coordenadora do estudo Simone Fisher (telefone: 5576-4961). Poderá dirigir-se também ao Setor de Lipídeos, Aterosclerose e Biologia Vascular da UNIFESP (Rua Loefgren, 1350 – Vila Clementino – CEP04040-001 São Paulo-SP).

Com quem devo obter informações sobre meus direitos como indivíduo do estudo?

Comitê de Ética em Pesquisa
Tel: 5571-1062.
Rua Botucatu, 572. 1º andar, cj 14.
Email: cepunifesp@epm.br

Recebi informações verbais sobre o estudo e li o termo de consentimento escrito. Tive a oportunidade de discutir as informações que recebi e fazer perguntas. Aceito participar do estudo e sei que minha participação é totalmente voluntária. Entendo que posso desistir a qualquer momento em prejuízo ao meu atendimento médico futuro.

Ao assinar este termo de consentimento livre e esclarecido, concordo que meus dados pessoais (incluindo os relativos ao meu exame físico, estado mental, doença rara ou etnia) possam ser usados como descritos neste termo.

Entendo que receberei uma cópia deste informativo.

Versão3_21_06_2017
paciente_____

pesquisador_____

Pág 05 de 06



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – Escola Paulista de Medicina
Setor de Lipídes, Aterosclerose e Biologia Vascular

Prof. Dr. Francisco Antonio Helfenstein Fonseca (Pesquisador Principal)

data: _____

Assinatura do paciente

Nome do paciente em letra de forma

data: _____

Assinatura do investigador que obteve o consentimento

Nome do investigador que obteve o consentimento em letra de forma

Versão3_21_06_2017
paciente _____

pesquisador _____

Pág 06 de 06